

PDF hosted at the Radboud Repository of the Radboud University Nijmegen

The following full text is a publisher's version.

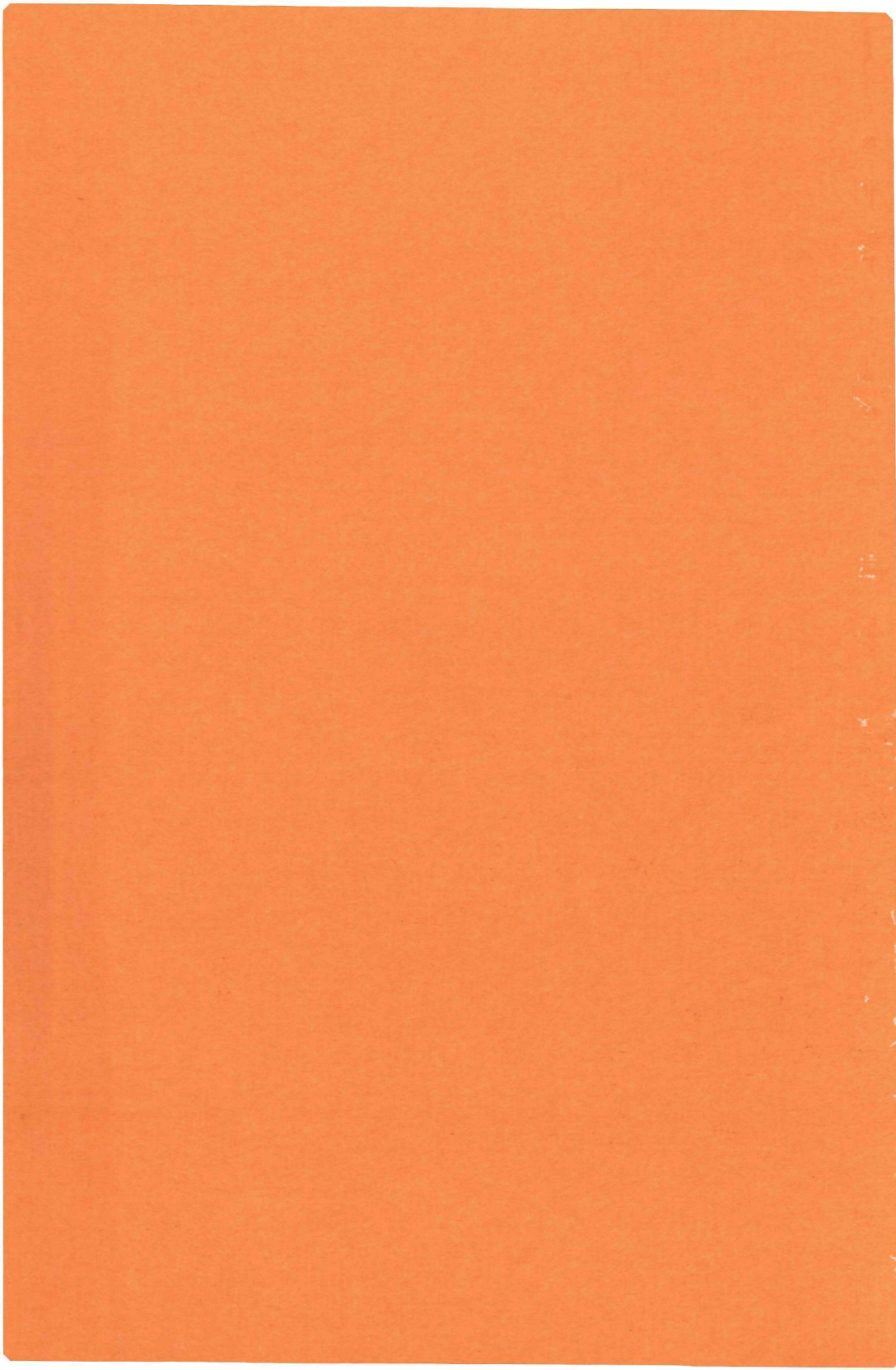
For additional information about this publication click this link.

<http://hdl.handle.net/2066/147516>

Please be advised that this information was generated on 2017-12-05 and may be subject to change.

Fysiologische, biochemische
en histochemische aspecten
van de hydrolasen bij de rivier-
kreeft, *Astacus leptodactylus*

F. van Herp



**FYSIOLOGISCHE, BIOCHEMISCHE EN HISTOCHEMISCHE ASPECTEN
VAN DE HYDROLASEN BIJ DE RIVIERKREEFT,
ASTACUS LEPTODACTYLUS**

Promotor: Prof. Dr. J.M. Denucé

**FYSIOLOGISCHE, BIOCHEMISCHE
EN HISTOCHEMISCHE ASPECTEN
VAN DE HYDROLASEN BIJ DE RIVIERKREEFT,
ASTACUS LEPTODACTYLUS**

P R O E F S C H R I F T

**TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR
IN DE WISKUNDE EN NATUURWETENSCHAPPEN
AAN DE KATHOLIEKE UNIVERSITEIT TE NIJMEGEN,
OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS,
MR. W.C.L. VAN DER GRINTEN,
HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT
DER RECHTSGELEERDHEID,
VOLGENS BESLUIT VAN DE SENAAT
IN HET OPENBAAR TE VERDEDIGEN
OP DONDERDAG 12 OKTOBER 1972
DES NAMIDDAGS TE 4 UUR**

DOOR

FRANÇOIS VAN HERP

GEBOREN TE VILVOORDE (BELGIE)

1 9 7 2

THOBEN OFFSET NIJMEGEN

Aan mijn vader en moeder
Aan Tinneke

INHOUD

1. Inleiding en probleemstelling	11
2. Histochemische aspecten van het hydrolasenpatroon	15
2.1. Lokalisatie van de hydrolase-activiteiten in de hepatopaneas	15
2.1.1. Microscopische anatomie en cytologie van de hepatopaneas	15
2.1.2. Materiaal en methoden	19
2.1.3. Resultaten	21
2.1.4. Discussie	27
2.2. Lokalisatie van de hydrolase-activiteiten in de hemolymfe	29
2.2.1. Hematologie van de hemolymfe	29
2.2.2. Materiaal en methoden	30
2.2.3. Resultaten	32
2.2.4. Discussie	33
3. Biochemische aspecten van het hydrolasenpatroon	35
3.1. Het optreden van 'multiple molecular forms' in het hydrolasenpatroon van <i>Astacus leptodactylus</i>	37
3.1.1. Inleiding	37
3.1.2. Materiaal en methoden	37
3.1.3. Resultaten	43
3.1.3.1. Het patroon van de multiële hydrolasen in het hepatopaneasextract	43
3.1.3.2. Het patroon van de multiële hydrolasen in het maagsap	50
3.1.3.3. Het patroon van de multiële hydrolasen in de hemolymfe	52
3.1.4. Discussie	57
3.1.4.1. Het patroon van de multiële hydrolasen in hepatopaneasextracten en maagsap	57
3.1.4.2. Het patroon van de multiële hydrolasen in de hemolymfe	61
3.2. Nadere karakterisering van de fosfatase-activiteit in hepato-	

pancreasextracten	62
3.2.1. Inleiding	62
3.2.2. Materiaal en methoden	63
3.2.3. Resultaten	65
3.2.4. Discussie	66
3.3. Kwantificeren van de enzymactiviteiten met behulp van biochemische analysemethoden	66
3.3.1. Inleiding	66
3.3.2. Materiaal en methoden	67
3.3.3. Statistische verwerking van de resultaten	69
4. Fysiologische aspecten van het hydrolysenpatroon	73
4.1. Onderzoek naar de invloed van de voedingstoestand op de hydrolase-activiteiten in de hepatopaneas en hemolymfe	75
4.1.1. Inleiding	75
4.1.2. De invloed van hongeren en voeren	76
4.1.2.1. Materiaal en methoden	76
4.1.2.2. Resultaten	77
4.1.2.3. Discussie	80
4.1.3. De invloed van een korte voedingsperiode na een lange hongerperiode op de hydrolasen van de hepatopaneas en hemolymfe	82
4.1.3.1. Materiaal en methoden	82
4.1.3.2. Resultaten	83
4.1.3.3. Discussie	92
4.2. Onderzoek naar de invloed van de neuroendocriene centra in de oogsteel op de hydrolase-activiteiten in hepatopaneas en hemolymfe	94
4.2.1. Inleiding	94
4.2.2. De invloed van sinusklierextirpatie op het hydrolasenpatroon bij gevoede en hongerende kreeften	95
4.2.2.1. Materiaal en methoden	95
4.2.2.2. Resultaten	97
4.2.2.3. Discussie	105
4.2.3. Histochemisch en elektroforetisch onderzoek van de oogsteelneurosecreten met betrekking tot hongeren en voeren	107
4.2.3.1. Inleiding	107
4.2.3.2. Materiaal en methoden	111
4.2.3.3. Resultaten	113
4.2.3.4. Discussie	114

4.3. Onderzoek naar de invloed van vervellingscyclus en jaargetijde op de hydrolase-activiteit in hepatopaneas en hemolymfe	119
4.3.1. Inleiding	119
4.3.2. De invloed van de vervelling op de hydrolasen van hepatopaneas en hemolymfe	120
4.3.2.1. Materiaal en methoden	120
4.3.2.2. Resultaten	120
4.3.2.3. Discussie	123
4.3.3. De invloed van het jaargetijde op de hydrolasen van hepatopaneas en hemolymfe	125
4.3.3.1. Materiaal en methoden	125
4.3.3.2. Resultaten	126
4.3.3.3. Discussie	127
5. Samenvatting en conclusie	129
6. Summary and conclusion	135
7. Bijlagen	141
7.1. Vervellingscyclus van de Crustacea, met name <i>Astacus sp.</i>	141
7.2. Nomenclatuur voor de 'multiple molecular forms' der enzymen	142
7.3. Herkomst van de specifieke chemicaliën	143
8. Literatuur	145

INLEIDING EN PROBLEEMSTELLING

De hydrolasen zijn bij talrijke substraatomzettingen in het dierlijk metabolisme betrokken. Hun betekenis voor het levend organisme blijkt in het bijzonder uit de studie van de spijsvertering. De voedingsstoffen, die door het dier worden opgenomen, zijn gewoonlijk grote polymeren met een hoog molecuulair gewicht. Verkleining van deze moleculen door enzymatische afbraak is noodzakelijk voor hun resorptie. Dientengevolge werd veel aandacht besteed aan de enzymklasse der hydrolasen, waartoe de spijsverteringsenzymen behoren.

De eerste enzymstudies bij Crustacea dateren uit het midden van de vorige eeuw. Schlemm (1844) en Lindner (1844) constateerden dat het secreet van de hepatopaneas bij *Potamobius (Astacus) astacus* kippe-eiwit, vet en cellulose kon afbreken. In 1877 en 1888 werden deze waarnemingen respectievelijk door Hoppe-Seyler en Stamati bevestigd. Voorts werd de kennis van de hydrolytische enzymen bij Crustacea aanzienlijk uitgebreid door bestudering van maagsap en hepatopaneas bij o.a. *Astacus*, *Carcinus*, *Maia*, *Orconectes* en *Procambarus*. De resultaten daarvan vindt men onder meer samengevat in overzichtsartikelen van Mansour-Bek (1954), Vonk (1960, 1964), Munday en Huggins (1968) en Van Weel (1970). In deze gegevens zijn duidelijk twee richtingen te onderkennen. In de eerste categorie zijn de onderzoeken gericht op de karakterisering van de voornaamste hydrolasen naar substraat-specificiteit, pH en invloed van activatoren en inhibitoren. De tweede groep van gegevens ligt meer in het vlak van het vergelijkend stofwisselingsonderzoek.

De grote verscheidenheid in de resultaten, welke bij genoemde richtingen tot uitdrukking komt, wordt in belangrijke mate verklaard door de aanpassing aan variabele externe milieufactoren. Zulks temeer wanneer men bedenkt dat de arthropoda, waartoe de Crustacea behoren, niet alleen op grond van het aantal species, doch ook met betrekking tot hun vermogen zich aan vrijwel elke ecologische situatie te adapteren, de meest belangrijke groep in het dierenrijk vormen. Uitgaande van het feitenmateriaal dient speciale aandacht te worden besteed aan de wisselwerking tussen het dier en

zijn milieu, waarbij niet mag worden uitgesloten dat de variabele milieufactoren (exogene) het dierlijk organisme doorgaans langs neurale en/of hormonale (endogene) weg beïnvloeden.

Een ritme in de secretiecyclus van proteasen, amylasen en lipasen van de hepatopaneas onder invloed der verschillende voedingstoestanden werd alleen geconstateerd door Jacobs en Hirsch (1928, 1930) bij *Astacus leptodactylus* en door Van Weel (1960) bij *Thalamita crenata*. Martin (1966) vond een voedingsritme bij *Marinogammarus* (speciesnaam niet vermeld) in relatie tot eb en vloed. Mews (1957) nam bij *Eriocheir sinensis* een verhoogde activiteit waar van de proteasen in het maagsap wanneer de krabben bij 20°C in plaats van bij 15°C werden gehouden. Fingerman (1967) vestigde voor het eerst de aandacht op een mogelijke neuroendocriene regulatie van de enzymatische activiteiten in de hepatopaneas van *Procambarus clarkii*. In 1970 schreef Van Weel: 'Finally, it should be pointed out that certain factors can and do affect the rate of secretion by the midgut gland and the composition of the secretion material. This may be particularly true for neuroendocrines and maybe for sex hormones. It is quite possible that studies of digestive juice and midgut gland extracts in the same species, undertaken at different stages of the molt cycle, will lead to different results...' (p.113).

Jeuniaux (1971) belichtte in een overzichtsartikel inzake de hemolymfe bij Arthropoda de aanwezigheid van hydrolase-activiteiten in de lichaamsvloeistof en tevens het gebrek aan gegevens omtrent hun fysiologische betekenis.

In de laatste 20 jaar is voornamelijk uit klinische onderzoeken gebleken, dat zowel kwantitatieve als kwalitatieve veranderingen in het patroon van de bloedenzymen gewoonlijk gepaard gaan met specifieke fysiologische en/of anatomische veranderingen in de weefsels. Analyse van het enzympatroon in het bloed kan dienen als parameter voor fysiologische veranderingen onder invloed van exogene en/of endogene factoren. Tevens kan een geïntegreerde studie van enzymatische activiteiten in de organen en het bloed het inzicht in hun interne wisselwerking bevorderen.

Ofschoon cyto- en histochemische onderzoeken over het algemeen waardevolle inlichtingen verschaffen over de lokalisatie van de reacties en aldus bijdragen tot het onderkennen van een relatie tussen structuur en functie (Rodyn 1967 e.a.), werd daaraan tot dusver weinig aandacht besteed bij Crustacea.

De snelle ontwikkeling van de enzymchemie en -fysica heeft ertoe bijgedragen, dat niet alleen kwantitatieve, doch ook kwalitatieve analysemethoden ter beschikking staan. Kwantitatieve analyses kunnen worden uitgevoerd met behulp van spectrofotometrische methoden; elektroforetische tech-

nieken, zoals disc-elektroforese, maken het mogelijk de heterogeniteit van de enzymen na te gaan. Enzym-histochemische methoden kunnen worden aangewend om bij een specifiek substraataanbod en microscopisch aantonen der omzettingsproducten de enzymatische activiteiten in weefsels en cellen te lokaliseren.

In het licht van deze gegevens beoogt onze studie de kennis omtrent de hydrolase-activiteiten in hepatopancreas en hemolymfe van *Astacus leptodactylus* te verdiepen. Eerst worden de verschillende hydrolase-activiteiten beschreven, die met behulp van histochemische methoden gelokaliseerd werden, om aldus de structuur-functie relatie vast te leggen (hoofdstuk 2). Hierop volgt een biochemische karakterisatie van de hydrolase-activiteiten met inbegrip van hun elektroforetische mobiliteit, heterogeniteit, substraat-affiniteit en inhibitoreninvloed (hoofdstuk 3). In hoofdstuk 4 wordt een beschrijving gegeven van het hydrolase-onderzoek in relatie tot variërende exogene en endogene factoren.

Het onderzoek had niet tot doel alle facetten in detail na te gaan, doch heeft een meer oriënterend karakter, ofschoon incidenteel dieper op enige aspecten wordt ingegaan. In de inleiding van elke paragraaf worden de relevante literatuur en de beschikbare gegevens in het kader van de betrokken experimenten besproken.

Proefobject

Het object van onderzoek was de rivierkreeft *Astacus leptodactylus* (Nordmann 1842). Deze soort wordt als vertegenwoordiger van de Astacura (familie Astacidae) gerangschikt onder de Reptantia, die tezamen met de Natantia alle decapode Crustacea omvatten.

De volwassen vormen (♂) kunnen een lengte bereiken van 13 cm, gemeten van rostrum tot en met telson. Zij hebben een donkerolijf tot roodbruine kleur. Van deze soort zijn twee subspecies bekend, die alleen op basis van hun verschillende niche en enkele geringe morfologische kenmerken van elkaar te onderscheiden zijn. *Astacus leptodactylus salinus* kan als 'steppe-vorm' van *Astacus leptodactylus leptodactylus* worden beschouwd. Hun biotoop omvat de slijkerige wateren van het Donaugebied (evenals van de Dnjepr). In het oosten reikt hun verspreidingsgebied tot in de Oekraïne. In de Bosporus worden zij eveneens aangetroffen.

De kreeften werden via een exporthandel in Oostende (België) uit Turkije betrokken. Bij aankomst in het laboratorium werden zij in asbest aquariumbakken ondergebracht. Om een regelmatige waterdoorstroming te verkrijgen, waren deze volgens een 'cascade-systeem' opgesteld, waarbij leidingwater via overloophoeven van de bovenste naar de lagerstaande bekkens stroomde. Op

deze wijze bevonden de kreeften zich constant in vers, stromend water, waarvan de temperatuur varieerde van 12 tot 14°C. Hun voedsel, bestaande uit stukjes runderhart gevarieerd met lever, werd 's avonds toegediend; 's ochtends werden de eventuele etensresten verwijderd om vervuiling van het water te voorkomen.

Onder deze omstandigheden werd, na een acclimatisatieperiode van circa een week de mortaliteit sterk gereduceerd. Tijdens een verblijf van 3 à 4 maanden in deze voorraadbakken kwam vervelling zelden voor.

De kreeften die voor de verschillende experimenten geselecteerd waren, werden 4 à 5 dagen vóór aanvang van het experiment geïsoleerd in kleine bakjes, die in een donkere ruimte, eveneens in 'cascade-vorm' waren opgesteld. De waterstand bedroeg ongeveer 5 cm, de temperatuur werd constant op $\pm 13^{\circ}\text{C}$ gehouden.

Tenzij anders vermeld, werden voor alle experimenten kreeften gebruikt, die zich in het 'intermoult' of C-stadium bevonden (zie bijlage 1).

HISTOCHEMISCHE ASPECTEN VAN HET HYDROLASENPATROON

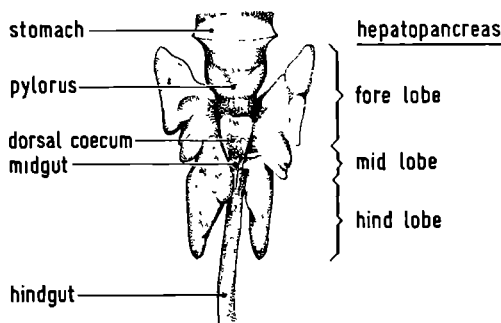
2.1. LOKALISATIE VAN DE HYDROLASE-ACTIVITEITEN IN DE HEPATOPANCREAS

2.1.1. Microscopische anatomie en cytologie van de hepatopancreas

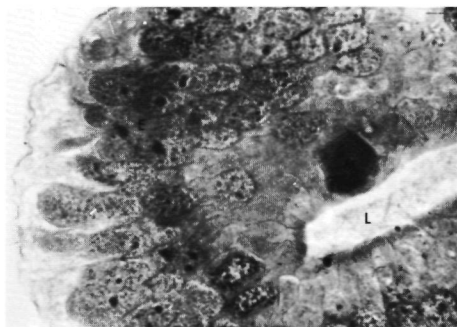
De hepatopancreas van decapode Crustacea, waartoe *Astacus leptodactylus* behoort, bestaat uit twee tubulaire uitstulpingen van de korte middendarm, die elk weer zijn onderverdeeld in een voor-, midden- en achterlob. Elke lob is opgebouwd uit vele enkelvoudige tubuli, die een lengte bereiken van 2 tot 4 mm en een diameter van $\pm 0,2$ mm. Aan één uiteinde eindigen de tubuli blind, terwijl aan het andere hun lumen in een secundair afvoerkanaal overgaat. Deze secundaire afvoergangen monden tezamen uit in een primaire secretie- of gemeenschappelijke gang, die ventraal in de middendarm uitmondt. De tubuli zijn van elkaar gescheiden door losmazig bindweefsel, dat bloedsinussen en bloedcapillairen van de arteria hepatica insluit. Het gehele orgaan wordt door een dun vliesje omgeven (figuur 1).

Fig.1. Dorsal view of the hepatopancreas from *Astacus leptodactylus* (after Hirsch and Jacobs 1929)

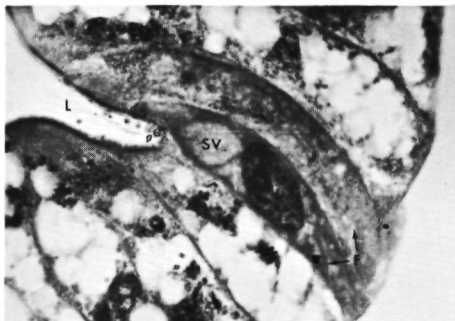
Fig.1. Dorsaalaanzicht van de hepatopancreas bij *Astacus leptodactylus* (naar Hirsch en Jacobs 1929)



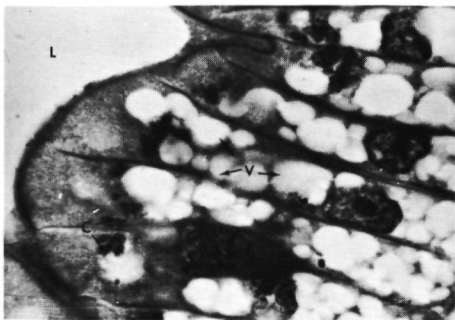
Het epitheel van tubuli, secundaire en primaire afvoergang is éénlagig, cilindrisch en wordt door een basaalmembraan verstevigd. Deze membraan is



(A)



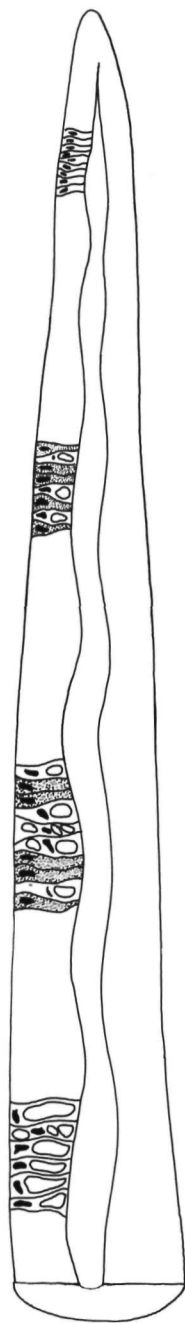
(B)



(C)



(D)



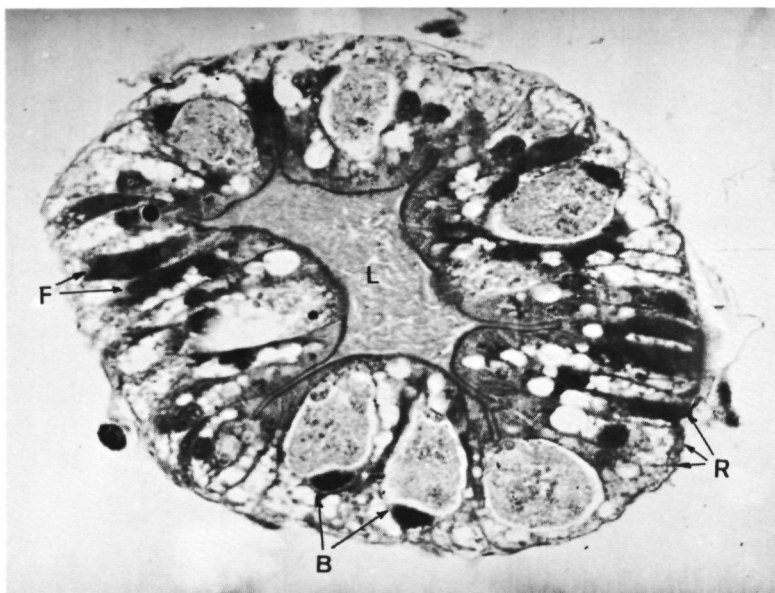


Fig.2. Topography of a hepatopancreas tubule

A: Section through the apex of a tubule showing the E-cells

B: Section through the zone of differentiation showing two F-cells

C: Section through the zone of differentiation showing the R-cells

D: Section through the B-cell zone

E: Cross-section through a tubule showing the different cell-types

B: goblet or B-cell

C: calcospherites

E: embryonic or E-cell

F: fibril or F-cell

L: lumen of tubule

M: cell in division

R: rest or R-cell

SV: supranuclear vacuole

V: vacuole

Fig.2. Topografie van een hepatopancreastubulus

A: Doorsnede door de top van een tubulus die de E-cellen laat zien

B: Doorsnede door de differentiatie-zone die twee F-cellen laat zien

C: Doorsnede door de differentiatie-zone die de R-cellen laat zien

D: Doorsnede door de zone der B-cellen

E: Dwarsdoorsnede door een tubulus die de verschillende celtypen laat zien

B: blaas- of B-cel

C: calcosferieten

E: embryonale- of E-cel

F: fibrillen- of F-cel

L: tubulustlumen

M: cel in deling

R: rust- of R-cel

SV: supranucleaire vacuole

V: vacuole

voorzien van een myoepitheliaal netwerk, opgebouwd uit fijne protoplasma-strengen afgewisseld met ringspierbundels, die op regelmatige afstanden ($\pm 35 \mu$) in de membraan worden geïnserieerd (Ogura 1959; Loizzi 1971). Ook de secundaire gang is met spierbundels bekleed.

In de oudste cytologische studies (Weber 1880; Frenzel 1893; Dorman 1928) worden twee celtypen beschreven: de zogenaamde 'hepatische' vet-houdende cellen en de 'pancreatische' of enzymproducerende cellen. Jacobs (1928) breidde in een studie over *Astacus leptodactylus* deze klassificatie tot vier hoofdtypen uit: apicaal de E- (of embryonale) cellen met mitose-activiteit, die zich proximaal differentiëren tot F- (of fibrillen) cellen, welke gekarakteriseerd worden door een basofiel cytoplasma en meestal één enkele supranucleaire vacuole; R- (of (rest-*) cellen met glycogeen, vetdruppels en meerdere vacuolen; tenslotte B- (of blaas-) cellen met één grote vacuole omgeven door basofiel cytoplasma. Op grond van deze vier celtypen kon de hepatopancreastubulus in vier zones worden verdeeld (figuur 2): de apex (E-cellen), differentiatiezone (R- en F-cellen), B-cel zone (waartussen R- en F-cellen) en de proximale zone (met volgroeide B- en degenererende R- en F-cellen).

De functionele cytologie van de hepatopancreas werd bestudeerd door Hirsch en Jacobs (1928, 1930). Daarbij kwam duidelijk naar voren, dat de opeenvolging van de verschillende celtypen kon worden herleid tot een opeenvolging van celfasen. Zij concludeerden dat B-cellen (laatste fase) de enzymen secreteerden volgens het schema: E (eerste fase) \rightarrow F (tweede fase) \rightarrow B, en dat de gesecreteerde enzymen op holocriene wijze in het lumen terechtkwamen en naar de maag werden afgevoerd. De R-cellen konden, volgens dezelfde auteurs, onafhankelijk hiervan als tweede fase uit E-cellen ontstaan. In tegenstelling tot deze hypothese werden in meer recente publicaties alternatieve differentiatiecycli beschreven: cyclische regeneratie van B- uit F-cellen bij *Atya* (Van Weel 1955); drie onafhankelijke celtypen bestaande uit R-, F- en B-cellen bij *Procambarus* (Ogura 1959) en de cyclus E \rightarrow R \rightarrow B \rightarrow F, eveneens bij *Procambarus* (Davis en Burnett 1964), waarbij men het holocriene secretietype uitsloot. Terwijl in deze studies de B-cel als secretorisch celtype werd beschouwd, beschreven Travis (1955) in een licht-microscopische studie van *Panulirus* en Bunt (1966) in een elektronen-microscopische studie van *Procambarus* de B-cel als degenererende R-cel, terwijl de F-cel de enzymen synthetiseerde en secreteerde. Loizzi (1971) kwam door elektronenmicroscopisch onderzoek van *Procambarus* en *Orconectes* tot dezelfde conclusies als Hirsch en Jacobs (1928, 1930), namelijk: R-cellen zijn typisch absorberende cellen en vergelijkbaar met de absorberen-

* Door Ogura (1959) en Davis en Burnett (1964) absorberende cellen genoemd.

de cellen in de darm en met de parenchymale cellen in de lever van vertebraten, F-cellen produceren enzymen, die in een supranucleaire vacuole worden opgehoopt, B-cellen zijn getransformeerde F-cellen en secreteren enzymen

Tegenstrijdige meningen bestonden ook met betrekking tot de regeneratie van het tubulusepitheel Frenzel (1893) stelde dat de epitheelcellen in de tubuli zich amitotisch konden vermeerderen en beschreef dit verschijnsel als 'nucleolare Kernhalbierung' Ziegler en Von Rath (geciteerd door Frenzel 1893) vonden bij jonge rivierkreeften talrijke mitosen in het apex-gedeelte van de kliertubuli en veronderstelden dat deze delingen verantwoordelijk waren voor de regeneratie van de tubuli-epithelia Niettemin erkenden ze dat cellen, die zich reeds verder gedifferentieerd hadden, zich nog amitotisch konden delen Latere literatuurgegevens maakten geen melding van dit delingsfenomeen (o a Apathy 1906, Hirsch en Jacobs 1928, 1930)

Figuur 2 geeft ook de verschillende celtypen (celfasen) weer De histologische preparaten werden gekleurd volgens de Ponceaurood-Heidenhain-blauwmethode van Plantevin en Nardon (1970). De opnamen werden gemaakt met Leitz- Orthoplan apparatuur en een Kodak-Panchromatic X-film (32 ASA)

In dit gedeelte van het werk wordt met behulp van histochemische methoden de lokalisatie van de activiteit der spijsverteringsenzymen in de hepatopancreas nagegaan

2.1.2. Materiaal en methoden

Voor het histochemisch onderzoek werden 'intermoult' kreeften gebruikt, die gedurende drie weken om de andere dag werden gevoed met een mengsel van runderhart en -lever, 12 Uur na de laatste voeding werd elke kreeft gedurende ± 5 minuten in ijswater ondergedompeld, waardoor zijn bewegingsactiviteit werd vertraagd Na decapitatie werd de carapax onmiddellijk verwijderd en de klier vrijgeprepareerd Door een incisie in de pylorus-streek en aan het begin van de einddarm werd de hepatopancreas uit de lichaamsholte verwijderd, in koude fysiologische oplossing (Van Harreveld 1936, gewijzigd volgens Andrews 1967) gespoeld, verdeeld in groepjes van 20 à 30 tubuli en in het ijsgekoelde fixatief gebracht

A Fixatie en nabehandeling van de weefselstukjes*

De Ca-formol-fixatiemethode volgens Baker (1944) en Pearse (1961) gaf

* Matenaal bestemd voor de amylase-proeven werd niet gefixeerd

de beste resultaten voor het aantonen van esterase- en fosfatase-activiteiten in de hepatopancreas. De activiteitsdaling na fixatie was gering en de structuur van het weefsel werd optimaal geconserveerd.

Na fixatie in een mengsel van 4% formaldehyde en 0,1% CaCl_2 gedurende 24 uur bij 4°C, werd het weefsel gespoeld in gedistilleerd water gedurende 24 uur bij 4°C, vervolgens overgebracht in drie koude absolute aceton-baden van elk 20 minuten en twee baden van elk 30 minuten en geïncubeerd in chloroform gedurende 90 minuten bij kamertemperatuur. Na een kort bad met een chloroform/paraffinemengsel (5 : 1) bij 40°C, paraffine (smeltpunt 37-40°C) en paraffine (smeltpunt 58-60°C) werden de kliertubuli in verband met de afname van de enzymactiviteit bij precies 60°C in paraffine ingeblokt, gesneden in 5 μ dikke dwarscoupes en met glycerine-gelatine ter adhesieverbetering op de objectglasjes gekleefd. Tenslotte worden ze 24 uur gedroogd bij kamertemperatuur en in xylol gedeparaffineerd.

Voor het aantonen van de protease-activiteit in de kliertubuli werd hetzelfde fixatiemiddel gebruikt. Na fixatie gedurende 2 à 3 uur bij 4°C in een Ca-formolmengsel en 1 uur spoelen in koude aqua dest. werden de weefselstukjes na verwijderen van het overvloedige water in cryoform ingesloten en in het vriesvak van de cryostaat (Model CTD Harris-cryostat) ingevroren. Wanneer het weefsel in andere media, zoals gelatine, arabische gom en waterige 30% sucrose-oplossing, werd ingesloten, ging de structuur geheel verloren; het invriezen met behulp van vloeibare stikstof of droogijs bleek te rigoreus voor het zachte weefsel. Na bereiken van de geschikte 'snijtemperatuur' werden 14 μ dikke cryostaatcoupes gesneden.

Met behulp van vers, ongefixeerd weefsel werd getracht de amylase-activiteiten aan te tonen. Vers uitgerepareerde tubuligroepjes werden in koude fysiologische oplossing (volgens Andrews 1967) gespoeld en verder volgens dezelfde procedure als beschreven voor de proteasen bewerkt.

B. Histochemisch onderzoek van esterasen, 'zure' en 'alkalische' fosfatasen

De bovengenoemde hydrolasen kunnen met behulp van histochemische methoden, gebaseerd op het zichtbaar maken van de enzymactiviteit via metaalzoutneerslagen of naphthol-diazoniumzoutcomplexen, worden aangetoond. Aangezien met de metaalzoutmethoden het in de hepatopancreas aanwezige calcium en fosfaat eveneens zichtbaar wordt gemaakt (Miyawaki et al. 1961; Van Herp 1970) en bovendien met azokleurstofmethoden een vrij scherpe lokalisatie wordt verkregen, werden laatstgenoemde voor het onderzoek gebruikt.

1. Esterasen

De esterase-activiteit werd aangetoond volgens de methode van Burstone

(1958) met α -naphthylacetaat als substraat, waarbij de oorspronkelijke 0,1 M veronalbuffer pH 8,2–8,8 werd vervangen door 0,1 M KH_2PO_4 -buffer pH 7,4. De incubatie in de substraat-diazoniumzoutoplossing (met Fast blue BB) nam 30 minuten in beslag. Deze oplossing werd elke 10 minuten ververs.

2. 'Zure' en 'alkalische' fosfatasen

'Zure' fosfatase-activiteiten werden optimaal aangetoond door incubatie in naphthol-AS-MX-fosfaat als substraat bij pH 5,2 (Burstone 1958). De incubatie bedroeg 60 minuten; elke 10 minuten werd het substraat-diazoniummengsel (Fast Red Violet LB) ververs.

De 'alkalische' fosfatase-activiteiten werden, evenals esterasen en 'zure' fosfatasen, met behulp van een simultane koppelingsmethode aangetoond. Na- α -naphthylfosfaat werd maximaal gehydrolyseerd bij pH 8,3. Derhalve werd de methode geciteerd in Spannhof (1967) aangehouden. De incubatie duurde 60 minuten. Fast blue BB werd als 'coupler' gebruikt.

Voor de drie enzymen werd de hydrolyse van de desbetreffende substraten beëindigd door spoelen in stromend leidingwater.

Als controle van de specificiteit der kleuringen werden ook incubaties zonder substraten uitgevoerd.

C. Histochemisch onderzoek van proteasen en amylasen

Teneinde de protease- en amylase-activiteiten in de hepatopancreastubuli te lokaliseren, werd de contactafdrukmethode van Denker (1969) voor de proteasen en van Tremblay (1962) voor de amylasen toegepast.

De cryostaatcoupes werden opgevangen op objectglasjes, die bedekt waren met een substraatfilm van gelatine voor de proteasen of gehydrolyseerd zetmeel voor de amylasen. Deze glasjes werden in een vochtige ruimte bij 37°C gedurende verschillende tijden geïncubeerd. Na inwerking werden ze gefixeerd in een verdunde formoloplossing (formol 30 cc, aqua dest. 70 cc; < 20°C). De plaats van de enzymactiviteit werd zichtbaar na kleuring van de substraatfilm met toluidine-blauw (voor gelatine) of lugol (voor zetmeel). Daar waar het substraat door de enzymwerking werd afgebroken, trad geen kleuring op. Om de 'uitgevreten' plaatsen in de weefselcoupes te situeren, werd indien nodig nagekleurd met neutraal rood.

2.1.3. Resultaten

Door middel van de bovengenoemde histochemische technieken werden de hydrolytische enzymactiviteiten als volgt gelokaliseerd.

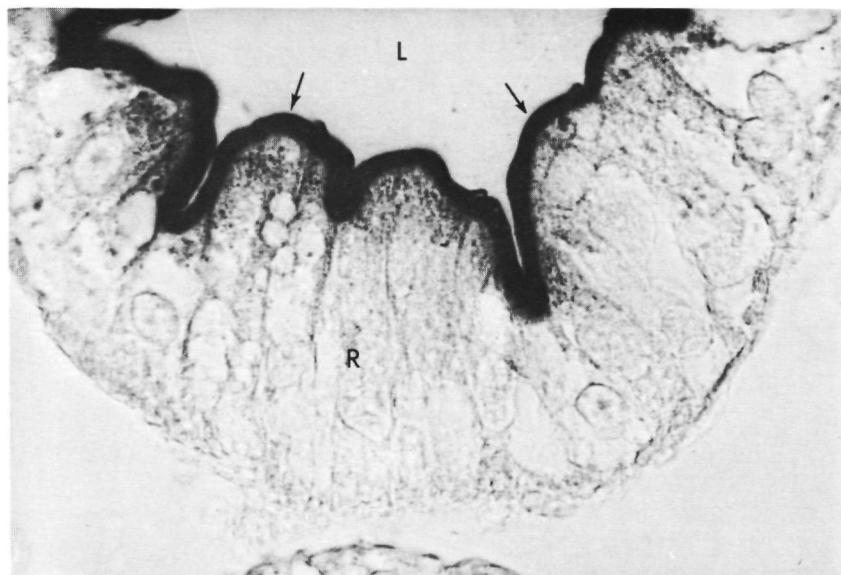
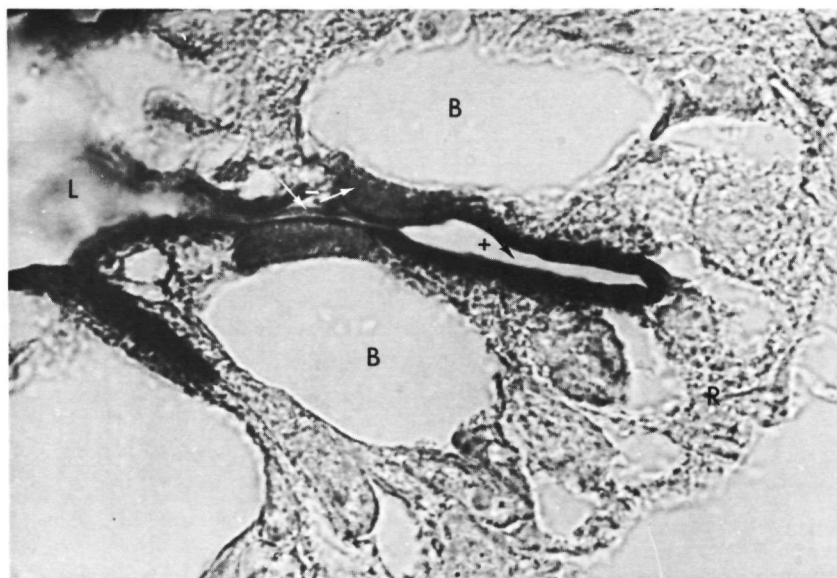


Fig.3a.

Fig.3b.



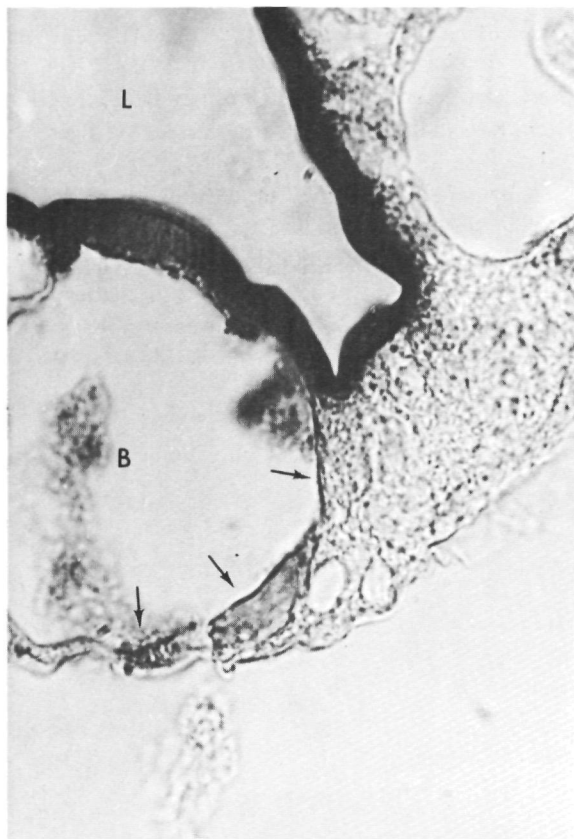


Fig.3c.

Fig.3. Visualization of the esterase activity

- Cross-section through a hepatopancreas tubule showing uniquely the R-cells (R, R-cells; L, lumen; ↗ esterase activity on the brush border)
- Cross-section through a hepatopancreas tubule showing two B-cells (B, B-cell; L, lumen; ↗ + esterase activity on the brush border of a few R-cells; ↗ - lack of activity on the brush border of the B-cells)
- High-power microphotograph showing the esterase activity on the vacuole membrane of a B-cell

Fig.3. De esterase-activiteit in beeld

- Dwarsdoorsnede door een hepatopancreastubulus die de R-cellen laat zien (R, R-cellen; L, lumen; ↗ esterase-activiteit in de borstelzoom)
- Dwarsdoorsnede door een hepatopancreastubulus in de B-cel-zone (B, B-cel; L, lumen; ↗ + esterase-activiteit in de borstelzoom van een paar R-cellen; ↗ - de esterase-activiteit ontbreekt in de borstelzoom van de B-cellen)
- Esterase-activiteit op de vacuole-membraan van een B-cel

A. Esterasen

De hoogste esterase-activiteit werd met behulp van het naphthol-diazo-complex zichtbaar in de zone van de F- en R-cellen. De borstelzoom van de R-cellen vertoonde een fel bruin-zwart gekleurde zone. In de borstelzoom van de F-cellen was de kleurintensiteit geringer. Op de grens van het lumen en de B-cellen was meestal geen activiteit aantoonbaar. Deze cellen reageerden daarentegen positief in de omgeving van de grote vacuolemembraan. E-cellen reageerden negatief.

Incidenteel was een positieve esterasureactie aantoonbaar in de lymfe van de bloedsinussen tussen de tubuli. Fluctuaties in de intensiteit van de enzymatische reactie waren duidelijk waarneembaar.

Figuur 3 geeft een overzicht van de esterase-actieve zones in de verschillende celtypen.

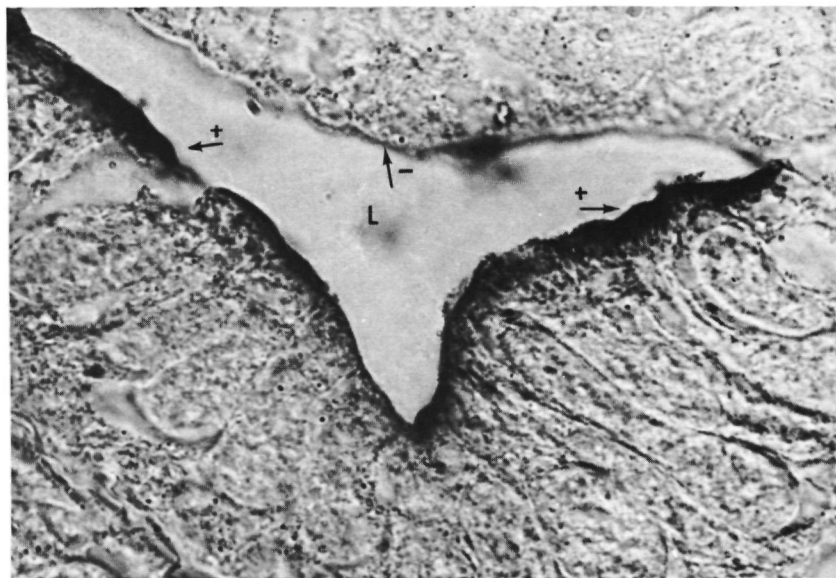


Fig.4. Visualization of the 'acid' and 'alkaline' phosphatase activity

Fig.4. De 'zure' en 'alkalische' fosfatase-activiteit in beeld

Cross-section through a hepatopancreas tubule showing the R-cell region (L, lumen; \nearrow + phosphatase activity on the brush border; \nearrow - lack of activity)

Dwarse doorsnede door een hepatopancreastubulus ter hoogte van de R-cel-zone (L, lumen; \nearrow + fosfatase-activiteit in de borstelzoom; \nearrow - geen activiteit)

B. 'Zure' en 'alkalische' fosfatasen

In het algemeen was de intensiteit van de fosfatase-activiteit gering tot matig. De grootste enzymatische activiteit was geconcentreerd in de borstel-zoom van de R-cellen en rond de calcosferieten, die in het apicale deel van deze laatste voorkomen. Incidenteel kleurden ook de basaalmembraan en de periferie van de vacuolen in de B-cellen positief. De E-cellen reageerden negatief.

In figuur 4 zijn de fosfatase-actieve zones weergegeven.

C. Proteasen

Wegens diffusieverschijnselen, welke bij de contactafdrukmethoden moeilijk vermeden kunnen worden, is de exacte lokalisatie van de protease-activiteit in de cellen zelf nauwelijks te realiseren. Een situering van de protease-activiteit per celtype is echter wel mogelijk. Na behandeling van de gelatine-film, zoals hierboven beschreven, waren duidelijk 'uitgevreten' zones aanwezig in het B-celtype. Daarentegen werd de gelatinelaag niet aangetast door coupes uit de zone van E-cellen (tubulus-apex) en F+R-cellen (differentiatie-zone). Uitgaande van deze resultaten moet de protease-activiteit worden gelokaliseerd in de B-cellen.

Figuur 5 geeft de protease-activiteit weer van een coupe uit de B-cel zone.

D. Amylasen

Het aantonen van de amylase-activiteit was technisch niet mogelijk. Het feit dat de amylase-activiteit in gefixeerd materiaal niet aantoonbaar is, maakte het gebruik van ongefixeerd, vers materiaal noodzakelijk. Structuur-behoud van de cellen was echter bij het laatstgenoemde materiaal evenmin mogelijk. De opzet van het experiment, de amylase-activiteit te lokaliseren in de cellen van de hepatopancreastubulus, kon tot op heden niet worden gerealiseerd.

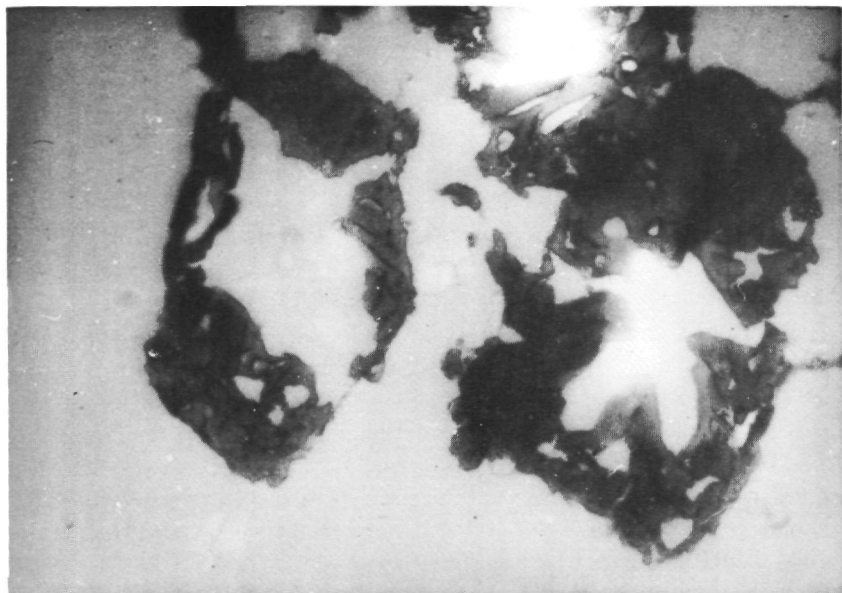
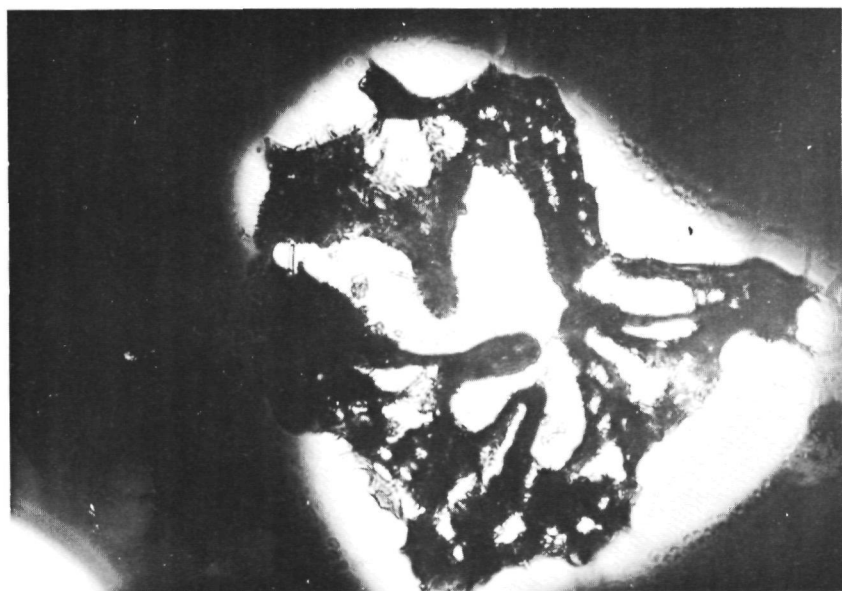


Fig.5a.

Fig.5b.



2.1.4. Discussie

Het voorkomen van esterase- en fosfatase-activiteiten voornamelijk in de borstelzoom van R-cellen duidt op een associatie van deze enzymactiviteiten met de microvilli in de borstelzoom, die mogelijk een belangrijke rol spelen bij het transport tussen tubulus-lumen en cel. Ugolev (1968) wees bij Mammalia op de actieve rol van de luminale kant van de borstelzoom bij het transport van kleinere metaboliëten vanuit het lumen naar de cel. De lokalisatie van bepaalde verteringsenzymen, beperkt tot het kleine oppervlak der microvilli, bevordert dit transport. Ugolev spreekt terecht van een 'membrane' of 'contact digestion' in vergelijking met een 'luminal' of 'cavital digestion'.

De negatieve reactie aan de lumenzijde der B-cellen, evenals de intensiteitsvermindering van de esterase-activiteit in de borstelzoom der F-cellen, is wellicht gecorreleerd aan de geringere dichtheid van microvilli bij F- en B-cellen. Zulks in tegenstelling tot de dichtheid van de microvillizoom bij R-cellen, zoals door Loizzi (1971) in een elektronenmicroscopische studie werd geconstateerd.

De aanwezigheid van esterases en fosfatasen op de vacuolemembraan (voornamelijk van B-cellen) zou kunnen wijzen op een transport van metaboliëten vanuit het cytoplasma naar de vacuole en omgekeerd. Het is ook denkbaar dat dit enzym wordt gesynthetiseerd in de B-cellen zelf of in een voorfase van de B-cel (vermoedelijk F-cel), om na een verdere differentiatie tot volgroeide B-cel te worden gesecreteerd.

Het optreden van fosfatase-activiteiten rond de calcosferieten in de luminale zone van de R-cellen zou in verband kunnen staan met defosforylatie- en fosforylatiereacties, die bij het transport van de reserve aan calcosferieten optreden.

Fig.5. Visualization of the protease activity

- a. Cross-section through hepatopancreas tubules in the R- and F-cell zone. No digestion of the gelatin film can be detected after toluidin staining.
- b. Cross-section through a hepatopancreas tubule in the B-cell zone. The gelatin layer is intensively digested by protease activity.

Fig.5. De protease-activiteit in beeld

- a. Dwarsdoorsnede door een hepatopancreastubulus in de R- en F-cel-zone. Na toluïdinekleuring is geen vertering van de gelatinefilm te zien.
- b. Dwarsdoorsnede door een hepatopancreastubulus in de B-cel-zone. De gelatinelaag is in hoge mate aangetast door de protease-activiteit.

Uit onderzoekingen bij Mammalia is immers gebleken dat de fosfatasen een belangrijke rol vervullen bij de fosforylatieprocessen. Gewoonlijk zijn deze enzymatische activiteiten gelokaliseerd in de zone van de borstelzoom, maar kunnen echter ook in een aantal andere celstructuren voorkomen. Defosforylatie van glucose-1-fosfaat vindt plaats in borstelzoom, nucleï, cytoplasma en muscularis mucosa van de darmwand. De vergelijkbare lokalisatie van alkalische fosfatasen in darmepitheel, niertubuli, erythrocyten en andere celtypen doet veronderstellen dat de fosfatasen een belangrijke rol vervullen bij het transportsysteem der cellen.

De soms zwakke positieve reacties van de voor fosfatasen gebruikte histochemische methoden zouden te wijten kunnen zijn aan de remmende invloed van metalen, zoals ijzer en calcium, die eveneens in de hepatopancreas voorkomen (Miyawaki et al. 1961).

De aanwezigheid van zowel 'zure' als 'alkalische' fosfatase-activiteiten in dezelfde gebieden van de hepatopancreastubuli doet twee vragen rijzen: zijn er inderdaad twee enzymen aanwezig in dezelfde celtypen, of is de positieve reactie te wijten aan de activiteit van één enzym in een breed pH-gebied? Wachtstein et al. (1962) toonden in de nier van Mammalia zure en alkalische fosfatase-activiteiten aan in de borstelzoom van de proximale tubuli. Dit verschijnsel werd toegeschreven aan een alkalische fosfatase met een activiteitsspectrum tot in het zure pH-gebied. Fuller en Owczarzak (1967) toonden beide enzymactiviteiten aan in granula en borstelzoom van de cellen van de 'groene' klier bij *Pacifastacus leniusculus*. Wij vonden beide activiteiten in de microvilli van voornamelijk R-cellen in de hepatopancreas van *Astacus leptodactylus*. In 3.2. zal aan dit fenomeen nader aandacht worden besteed.

Op grond van het voorafgaande zullen wij in deze studie gebruik maken van de termen 'zure' en 'alkalische' fosfatase-activiteiten.

Over het algemeen zijn onze waarnemingen in verband met de histochemische lokalisatie van 'alkalische' fosfatasen analoog aan die van Travis (1955, 1957) bij *Panulirus argus* en Miyawaki et al. (1961) bij *Procambarus clarkii*. De esterase-activiteiten, die werden aangetoond in de hepatopancreas van *Procambarus blandingi acutus* (Davis en Burnett 1964) en *Procambarus clarkii* (Loizzi en Peterson 1971) stemmen met onze resultaten overeen.

Hirsch en Jacobs (1928, 1930) kenden in een histofysiologische studie van de hepatopancreas bij *Astacus leptodactylus* een secreterende functie toe aan de B-cellen. Loizzi (1971) verdedigde deze stelling op grond van een elektronenmicroscopisch onderzoek aan de hepatopancreas van *Orconectes virilis* en *Procambarus clarkii*. Met behulp van een contactfilmmethode konden wij protease-activiteit lokaliseren in de zone der B-cellen. De aanwezigheid van de enzymatische activiteit als zodanig bevestigt de veronderstelde secretorische functie van de B-cellen. Een exacte lokalisatie van de activiteit in de

B-cel was door diffusieverschijnselen niet mogelijk. De afwezigheid van een duidelijke borstelzoom in de B-cellen (Loizzi 1971) en de gegevens omtrent zymogeengranula als precursors van de proteolytische enzymen in de pancreas van zoogdieren (Rodyn 1967) maken een eventuele lokalisatie van deze enzymactiviteiten aan de celgrens onwaarschijnlijk.

Onze resultaten illustreren dat de verschillende celtypen in de tubuli van de hepatopaneas niet alleen structureel, maar ook chemisch kunnen worden gekarakteriseerd. Bovendien tonen ze aan dat de spijsvertering bij *Astacus* op twee manieren verloopt. Terwijl de esterasen en fosfatasen voornamelijk in de 'membraanvertering' functioneren en de absorptie van kleine verteringsmetabolieten door de microvilli vergemakkelijken, zijn de proteasen (en vermoedelijk ook de amylasen) volgens het 'luminale verterings-type' werkzaam en hebben als zodanig hun hoofdfunctie bij de afbraak van grote metabolieten in de maag en de hepatopaneastubuli zelf.

Vooruitlopend op hoofdstuk 4 dient hier te worden vermeld, dat met de gebruikte histochemische methoden geen veranderingen in lokalisatie of activiteit werden waargenomen bij kreeften, die zich in uiteenlopende fysiologische toestanden bevonden (o.a. hongeren en voeden).

2.2. LOKALISATIE VAN DE HYDROLASE-ACTIVITEITEN IN DE HEMOLYMFEN

2.2.1. Hematologie van de hemolymfe

De bloedcellen van de hogere decapode Crustacea, waaronder de Astacidae, werden voor het eerst beschreven door Carus (1824), gevolgd door o.a. Hardy (1892) en Cuénot (1895). Tait en Gunn (1920) onderscheidden in de hemolymfe van hogere Crustacea drie celtypen: 'lymfoïde cellen', fijngranulaire 'thigmocyten' en grofgranulaire 'amoebocyten'. George en Nichols (1948) beschouwden deze drie typen als opeenvolgende ontwikkelingsfasen in correlatie met hun functies bij de bloedstolling, fagocytose en ophoping en/of transport van voedingsstoffen. Op grond van een elektronenmicroscopische studie kwam Stang-Voss (1971) bij *Astacus astacus* tot eenzelfde conclusie. Ook hij wees op de aanwezigheid van slechts één celtype met verschillende ontwikkelingsfasen overeenkomstig de functie. Hij noemde de fasen 'clotting-cells', fagocyten en granulaire amoebocyten.

Bij insecten werden aan de hemocyten in de hemolymfe meerdere functies toegeschreven, met onder meer een rol bij de bloedstolling, vorming van bindweefsel, fagocytose en productie van enzymen (Jones 1962). Zure en alkalische fosfatasen werden aangetoond door Vercauteren en Aerts (1958), amylase door Arvy en Gabe (1946). Een analogie naar functie van hemo-

cyten bij insecten enerzijds en amoebocyten bij crustaceeën anderzijds is evident, als zodanig is de productie van enzymen door laatstgenoemde amoebocyten niet uitgesloten. In vroegere literatuur werd immers van zogenaamde 'ferment-bodies' in het bloed van Crustacea gesproken. Anderzijds mag niet worden voorbijgegaan aan morfologische en biochemische studies van lysosomen, waaruit hun belangrijke functie bij een intracellulaire vertering is gebleken (Rodyn 1967) en de beschrijving van lysosoomachtige organellen in de fagocyterende amoebocyten bij *Astacus astacus* door Stang-Voss (1971). Hearing (1969) toonde met behulp van een gecombineerde elektronenmicroscopisch-histochemische methode zure fosfatase-activiteiten aan tegen de membraan van deze celorganellen bij *Homarus vulgaris*.

De vraagstelling omtrent herkomst en lokalisatie der hydrolase-activiteiten in de hemolymfe neemt nog in belang toe, wanneer men denkt aan het specifieke stollingsmechanisme, door Grégoire (1962) beschreven bij de voorname decapoden. Uit de 'clotting-cells' ('explosive cells' van Hardy) komt een thrombine-achtige stof vrij in het vloeibare gedeelte van de hemolymfe en maakt vanaf dat moment de stolling mogelijk. Het is niet uitgesloten dat tegelijk met deze factor ook enzymen vrijkomen en als zodanig in het serum aantoonbaar zijn.

In dit gedeelte van het werk wordt de lokalisatie van de esterasen, de 'zure' en 'alkalische' fosfatasen in de bloedcellen en het plasma histochemisch en elektroforetisch nagegaan.

2.2.2. Materiaal en methoden

Gevoede, mannelijke kreeften die zich in het 'intermoult' stadium bevonden, werden als onderzoeksobject voor de lokalisatie der verschillende hydrolase-activiteiten gebruikt.

A. Verzamelen van de hemolymfe en preparatie van bloedcellen en plasma

Per monsterring werd circa 1,5 cc hemolymfe uit het lichaam van elk dier opgezogen en onmiddellijk behandeld met 0,5 cc anticoaguleervloeistof, bestaande uit fysiologische zoutoplossing (Andrews 1967), 0,01 M Na-citraat en 0,1 M EDTA om stolling tegen te gaan. Hierna werden de verzamelde monsters gedurende 10 minuten bij 125 g gecentrifugeerd. Na decantatie van de plasmafractie werden de bloedcellen geresuspenderd in verse anticoaguleervloeistof en opnieuw gecentrifugeerd. Het gedecanteerde plasma werd voor elektroforetisch onderzoek ingevroren. De spoelprocedure van de bloedcellen werd twee- tot driemaal herhaald. Tenslotte werden de bloedcellen in fysiologische zoutoplossing geresuspenderd en ofwel bewerkt voor elektro-

foretische analyse, of gefixeerd voor histochemisch onderzoek.

B. Histochemisch aantonen van esterasen en 'zure' en 'alkalische' fosfatasen

Na fixatie volgens de Ca-formol-fixatiemethoden van Baker (1944) en Pearse (1961) werden de bloedcellen gespoeld in aqua dest. en geïncubeerd in de verschillende substraatmedia. Voor het aantonen van de esterase-activiteit werd de methode van Burstone (1958) aangewend, waarbij naast α -naphthylacetaat ook α -naphthylbutyraat en -propionaat werden gebruikt. De lokalisatie van de fosfatasen werd nagegaan volgens de simultane koppelingsmethoden geciteerd in Spannhof (1967), waarbij Na- α -naphthylfosfaat als substraat werd gebruikt. Bij alle voornoemde methoden werd fast blue BB als 'coupler' gebruikt. Het verloop van de incubatie in de substraat-diazonium-zoutmengsels werd lichtmicroscopisch gevolgd.

De amylase-activiteit in de hemolymfracies (plasma en bloedcellen) werd niet onderzocht.

C. Elektroforetische analyse van de plasma- en bloedcelfracies

De plasmafracies, welke werden verzameld als beschreven in 2.2.2.A., waren direct geschikt voor disc-elektroforetisch onderzoek. Daarentegen werden de bloedcellen, met het oog op de elektroforetische scheiding, gedestruëerd door ultrasonificatie.

De verkregen celfragmenten werden met vloeibare stikstof bij -180°C ingevroren, gelyofiliseerd in een Virtis-lyofilisator en in aqua dest. opgelost ($\pm 100 \mu\text{l}$).

Voor de disc-elektroforese werd een gelsysteem gebruikt, waarbij het 'separation gel' een acrylamideconcentratie had van 7,0% bij pH 8,9 (Maurer 1968). De gelletjes werden geprepareerd volgens Davis (1962). De elektroforese werd uitgevoerd bij 4°C en nam $1\frac{3}{4}$ in beslag. De opgebracht hoeveelheid monster per gelletje bedroeg $50 \mu\text{l}$.

Ter karakterisering van de hydrolase-activiteiten werden de gelletjes na elektroforese geïncubeerd in de verschillende substraatoplossingen. Voor het aantonen van de esterase-actieve componenten werd de methode van Markert en Hunter (1959) gevolgd, waarbij α -naphthylbutyraat als substraat werd gebruikt. De 'zure' en 'alkalische' fosfatase-activiteiten werden nagegaan met de metaalzoutmethoden van Gomori (1950), met Na- β -glycerofosfaat als substraat. Voor de uitvoerige beschrijving van deze zymogramkleuringen wordt verwezen naar 3.1.2.C..

Amylasen werden niet onderzocht.

2.2.3. Resultaten

Na disc-elektroforese in een 7% gel bij pH 8,9 en incubatie in de substraat-diazoniumzoutmengsels treden alleen in de plasmafracties enzymatisch actieve banden op. De bloedcelfracties daarentegen reageren negatief. De zymogrampatronen van de esterasen en van de 'zure' en 'alkalische' fosfasen voor de plasma- en bloedcelfracties zijn weergegeven in figuur 6.

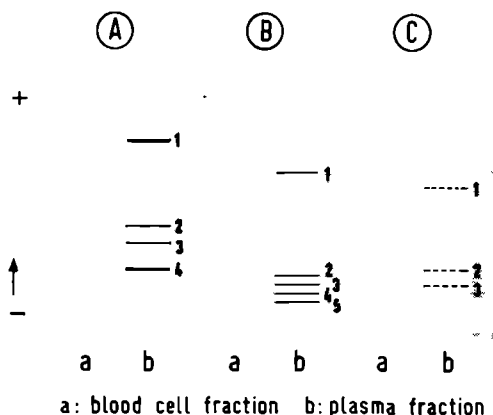


Fig.6. Zymograms of the hydrolases of the blood cell and plasma fraction of the hemolymph. A: esterasen (substraat: α -naphthyl butyrate pH 7,0), B: 'alkaline' phosphatases (substraat: Na- β -glycerophosphate pH 9,5), C: 'acid' phosphatases (substraat: Na- β -glycerophosphate pH 5,2)

Fig.6. Zymogram van de hydrolasen in de bloedcel- en plasmafractie van de hemolymfe. A: esterasen (substraat: α -naphthylbutyraat pH 7,0), B: 'alkalische' fosfasen (substraat: Na- β -glycerofosfaat pH 9,5), C: 'zure' fosfasen (substraat: Na- β -glycerofosfaat pH 5,2)

α -Naphthylbutyraat wordt door vier plasmatische esterase-actieve componenten gesplitst. Terwijl één fractie (1) naar de anode migreert, blijven drie fracties (2, 3 en 4) in het gebied van de kathode achter. Na- β -glycerofosfaat wordt vooral in basisch milieu door fosfatase-actieve componenten van het plasma gehydrolyseerd. Vijf banden zijn aantoonbaar na incubatie bij pH 9,0-9,5: band 1 ligt in het gebied van de anode, de banden 2, 3, 4 en 5 zijn kathodisch gelegen. Bij pH 5,2 wordt Na- β -glycerofosfaat soms gehydrolyseerd door drie fracties.

Met behulp van histochemische technieken konden noch esterase, noch 'zure' of 'alkalische' fosfatase-activiteiten in de bloedcellen worden aangetoond.

2.2.4. Discussie

Uit het elektroforetisch onderzoek van plasma en bloedcellen blijkt dat de hydrolase-activiteiten (esterasen en fosfatasen) alleen in het plasmagedeelte van de hemolymfe optreden. De verkregen zymogrampatronen zijn in grote mate vergelijkbaar met die van de serumanalyses, welke nog in deze studie zullen worden beschreven (3.1). De bloedcellen van de rivierkreeft *Astacus leptodactylus* zijn dus blijkbaar niet betrokken bij de productie en/of het transport van deze enzymen. Als zodanig kunnen de enzymatische activiteiten met behulp van de door ons gebruikte histochemische technieken niet in de bloedcellen worden aangetoond. In een elektronenmicroscopische studie toonde Hearing (1969) evenwel zure fosfatase-activiteiten aan in de 'lysosome-like bodies' van de bloedcellen bij *Homarus vulgaris*. Het is mogelijk dat deze fosfatase-activiteiten in de bloedcellen van de rivierkreeft niet aantoonbaar zijn met de door ons gebruikte histochemische methode. Het sporadisch optreden van drie 'zure' fosfatasefracties in disc-elektroferogrammen zou op een zwakke activiteit in het zure pH-gebied kunnen wijzen.

Uit literatuurgegevens blijkt dat de meeste enzymen in het bloed afkomstig zijn van andere weefsels. Bij de Mammalia, inclusief de mens, worden naast de lever ook het beenderstelsel en de galblaas, ofschoon in mindere mate, als mogelijke bron der alkalische fosfatase-activiteiten van het bloedserum beschouwd. Zure fosfatasen zijn daarentegen ook in de erythrocyten aangetoond. Wyatt (1961) en Laufer (1961) onderzochten de herkomst der enzymen in de hemolymfe van Insecta. Zij stellen o.a. de middendarm verantwoordelijk voor het optreden van esterase-activiteiten in de hemolymfe.

Het is niet uitgesloten dat ook bij Crustacea de enzymen van het bloed van andere weefsels afkomstig zijn. In verschillende paragrafen van deze studie zal hierop worden gewezen. In het laboratorium wordt dit verschijnsel momenteel met behulp van immunologische kruisreacties onderzocht.

BIOCHEMISCHE ASPECTEN VAN HET HYDROLASENPATROON

De fysiologie van de vertering bij Crustacea is uitvoerig bestudeerd bij enige genera, zoals *Astacus*, *Procambarus*, *Orconectes*, *Homarus*, *Maia* en *Carcinus*. Onze kennis van de hydrolasen bij Crustacea is aanzienlijk uitgebreid dank zij hun belangrijke rol bij dit verteringsproces (Mansour-Bek 1954, Vonk 1960, Munday en Huggins 1968, Van Weel 1970).

In een vergelijkende studie van Kooiman (1964) werden in het maagsap en in hepatopancreasextracten van *Astacus fluviatilis* en *Homarus vulgaris* als koolhydraatsplitsende enzymen aangetoond: cellobiase, maltase, isomaltase, amylase, β -1,3-glucanase, mannase en chitinase, terwijl xylanase, β -galactosidase (lactase) evenals saccharase, xylosidase en β -1,4-glucanase (cellulase) alleen bij *Astacus* werden geconstateerd. Het merendeel van deze carbohydralen werd ook in andere Crustaceeengroepen geïdentificeerd (o.a. Agrawal 1962, Martin 1966). Al is het voorkomen van een hoge amylase-activiteit in een pH-gebied tussen 5,0 en 7,8 bij de meeste Crustacea een vaststaand feit, toch blijft de verdere karakterisering van dit enzym controversieel. Blandamer en Beechey (1964) vermoedden dat bij *Carcinus maenas* uitsluitend een α -amylase werkzaam is. Vonk (1960) wees tevens op een β -amylase-activiteit bij sommige species. Agrawal (1962, 1963) spreekt van een specifieke 'glycogenase' bij *Orchestia gammarella* en *Corophium volutator*. Controverse informatie bestaat ook omtrent de vraag of cellulase en chitinase inderdaad door de hepatopancreas of door de aanwezigheid van symbiotische organismen worden gesecreteerd (Vonc 1960, Ray en Julian 1952). Recente onderzoekingen wijzen in de richting van een eigen productie van cellulase in de hepatopancreas van *Astacus sp.* (Kooiman 1964), *Panulirus japonicus* (Yokoe en Yasumasu 1964) en *Procambarus clarkii* (Yasumasu en Yokoe 1965) en van chitinase bij *Astacus fluviatilis* (Kooiman 1964) en *Eriocheir sinensis* (Jeuniaux 1960, 1963).

Het patroon van de eiwitplitsende enzymen is in grote mate vergelijkbaar met dat van de vertebraten: proteasen, amino- en carboxypolypeptidasen evenals dipeptidasen werden geïdentificeerd in maagsap en hepatopancreasextracten van alle onderzochte Crustacee-species (o.a. Mansour-Bek

1954; Vonk 1960). Een duidelijke trypsine-achtige activiteit werd waargenomen bij *Orconectes*, *Lirceus* en *Synurella* (Devillez 1965; Devillez en Buschlen 1967). Kleine (1967) vond geen of slechts weinig trypsine-achtige activiteit in de hepatopaneas van *Astacus astacus* in tegenstelling tot het maagsap en veronderstelt derhalve een secretie van inactieve proteolytische enzymen door de hepatopaneas, die op onbekende wijze in het maagsap zouden worden geactiveerd. Chymotrypsine lijkt afwezig in maagsap en hepatopaneas (Devillez 1965; Kleine 1967). Carboxy-, amino- en dipeptid-asen laten daarentegen een hoge activiteit in de tubuli van de hepatopaneas vermoeden (Kleine 1966, 1967).

Vetsplitsende enzymen komen waarschijnlijk in alle onderzochte species voor. Alhoewel de meeste enzymen esterasen zouden zijn, wees Vonk (1960) bij *Homarus* en *Panulirus* op de vertering van vetten door vermoedelijk lipasen. Agrawal (1963, 1964) beschreef de vertering van olie en melk door klierextracten van *Corophium volutator* en *Orchestia gammarella*. Martin (1966) vond niet-substraat-specifieke lipasen en esterasen in *Marinogammarus*. Kleine (1967) toonde, in tegenstelling tot de hepatopaneasextracten, in het maagsap van *Astacus astacus* een geringe lipolytische en esterolytische activiteit aan. Ofschoon 'emulsifiers' geen enzymatische activiteit bezitten, dient hier toch op hun aanwezigheid in de hepatopaneas te worden gewezen. Door hun oppervlaktewerking en het verkleinen van de partikelgrootte zouden zij bijdragen tot een snellere afbraak van vetten en esters (Vonk 1935, 1962).

In tegenstelling tot de gegevens over de hydrolasen in het spijsverteringskanaal (maagsap en hepatopaneas) werd tot op heden slechts weinig belangstelling getoond voor de studie van deze enzymen in de hemolymfe, ofschoon zij naast de hemocyaninen, die 80 tot 95% van de totale eiwitconcentratie innemen, tot de fysiologisch belangrijkste componenten van het bloed behoren (Jeuniaux 1971). Amylase-activiteit werd aangeleond bij *Astacus sp.* (Damboviceanu 1932) en bij *Callinectes sapidus* (Horn en Kerr 1969). Esterasen werden geïdentificeerd door Djangmah (1970) bij *Crangon vulgaris*; fosfatasen door Roche en Latreille (1934) bij een niet nader gedetermineerde krab en chitobiase door Jeuniaux (1963) in de hemolymfe van *Homarus vulgaris*.

In de volgende paragrafen zal nader worden ingegaan op enkele biochemische aspecten van de hydrolasen (proteasen, amylasen, esterasen en fosfatasen). In het eerste gedeelte wordt aan de hand van acrylamide disc-elektroforese de heterogeniteit, substraataffiniteit en inhibitoreninvloed nagegaan van de verschillende hydrolasen in hepatopaneas, maagsap en hemolymfe. In het tweede gedeelte worden de kolomchromatografisch onderzochte fosfatasen van de hepatopaneas behandeld. In het derde

gedeelte worden de verschillende spectrofotometrische methoden besproken met betrekking tot de kwantificering der onderzochte enzymactiviteiten

3.1 HET OPTREDEN VAN 'MULTIPLE MOLECULAR FORMS' IN HET HYDROLASENPATROON VAN *ASTACUS LEPTODACTYLUS* *

3.1.1 Inleiding

Enzymheterogeniteit is een algemeen verschijnsel in planten- en dierenrijk. Enzymen die dezelfde substraatspecificiteit bezitten en hetzelfde reactietype katalyseren, kunnen desondanks verschillen in elektroforetische mobiliteit, molecuulgrootte etc. Thans wordt algemeen aanvaard dat dergelijke enzymen voor bepaalde weefsels, en zelfs voor bepaalde cellen van een organisme, typerend zijn.

De heterogeniteit der enzymen kan met behulp van verschillende technieken, zoals elektroforese, chromatografie en immunochemie, worden bestudeerd. Acrylamide-disc-elektroforese, zetmeel- en immuno-elektroforese in agar gel stellen ons in staat de proteïnscheidingen zo perfect mogelijk uit te voeren. Gecombineerd met histochemische methoden (zymogramtechniek) biedt de elektroforese de mogelijkheid om proteïnen met multipel enzymkarakter zichtbaar te maken.

Bij Crustacea werd de multipliciteit der hydrolasen nauwelijks onderzocht. Ze werd nagenoeg alleen in vergelijking met het enzympatroon van vertebraten benaderd.

In dit gedeelte van het werk worden enkele eigenschappen van de hydrolasen in hepatopancreas, maagsap en hemolymfe van *Astacus leptodactylus* behandeld, o.a. het elektroforetische mobiliteit, heterogeniteit, substraat-affiniteit en effectoren.

3.1.2. Materiaal en methoden

Voor het elektroforetisch onderzoek werden regelmatig gevoede mannelijke kreeften in vervellingsstadium C gebruikt. Daartoe werden 12 kreeften geselecteerd naar gewicht en gedurende 21 opeenvolgende dagen in het reeds beschreven 'cascadesysteem' ondergebracht. De voedseltoediening, bestaande uit een mengsel van fijngemalen runderlever en -hart, vond om de andere dag plaats. 24 uur na de laatste voeding werden de kreeften door exsanguinatie en decapitatie gedood.

* Zie bijlage 2

A. Preparatie van het weefsel en voorbereidingen voor elektroforetische analyse

1. Hemolymfe

De hemolymfe werd uit het lichaam opgezogen en per dier onmiddellijk in een centrifugeerbuisje bij 4°C overgebracht. Nadat zoveel mogelijk lichaamsvloeistof was verzameld, werden de monsters ter verwijdering van bloedcellen en stollingsfragmenten gedurende 15 minuten gecentrifugeerd in een koelcentrifuge bij 2000 g. Het aldus verkregen serum werd na bepaling van het totale eiwitgehalte volgens Lowry (1951) verdund met 40% sucrose tot een eindconcentratie van 300 µg eiwit per 50 µl monster.

2. Maagsap

Het maagsap werd afgetapt met behulp van een plastic slangetje en opgevangen in een centrifugeerbuisje bij 4°C. De verkregen donkerbruine tot donkergroene vloeistof werd vervolgens met 0,1 M fosfaatbuffer, pH 7,6, verdund (1 : 1 v/v) en gedurende 5 minuten gecentrifugeerd bij 2000 g en 4°C.

3. Hepatopaneas

Het hepatopaneasweefsel werd na dissectie, zoals beschreven in 2.1.2. 1 minuut gespoeld in fysiologische zoutoplossing (volgens Van Harreveld 1936; gewijzigd door Andrews 1967) bij 4°C en na bepaling van het natgewicht gedurende 1 minuut gehomogeniseerd in een dubbel volume extractievloeistof (0,9% NaCl en 4,0% n-butanol). Na 1 uur werd het homogenaat bij 6000 g gedurende 10 minuten gecentrifugeerd. Het supernatans werd evenals het bloedserum met 40% sucrose verdund tot een eindconcentratie van 300 µg eiwit per 50 µl monster.

Het aldus voorbehandelde serum-, maagsap- en hepatopaneasmateriaal werd snel diepgevroren met vloeibare stikstof en in bevroren toestand bij -20°C bewaard.

B. Disc-elektroforese

Van de verschillende gelsystemen, zoals vermeld door Maurer (1968), bleken de volgende systemen het meest geschikt.

Voor de scheiding van de eiwitcomponenten, fracties met 'alkalische' en 'zure' fosfatase-activiteit, esterase- en amylase-activiteit uit het hepatopaneasmateriaal werd een gelsysteem gebruikt, waarvan het 'separation gel' een acrylamide-concentratie had van 7,5% bij pH 8,9.

Voor de proteasen in ditzelfde weefsel werd de acrylamide-concentratie opgevoerd tot 15% bij pH 8,9.

Voor de scheiding van de eiwitcomponenten en enzymatisch-actieve fracties in het hemolymfemateriaal werd een acrylamide-concentratie aangehouden van 7,0% bij pH 8,9.

De gelletjes werden geprepareerd volgens Davis (1962). Het 'sample gel' werd achterwege gelaten om ongewenste reacties, welke volgens Davis (1964) en Maurer (1968) tijdens de fotopolymerisatie kunnen optreden, te vermijden. Om verlies door sterke convectie te voorkomen, werd het monster in een 40% sucrose-oplossing op het gelletje opgebracht.

De elektroforese werd uitgevoerd bij 4°C en duurde gemiddeld 1¼ tot 1½ uur. De opgebrachte hoeveelheid monster per gelletje bedroeg 50 µl (300 µg eiwit).

C. Identificatie van de eiwitfracties na elektroforetische scheiding

Ter karakterisering van de verschillende hydrolase-activiteiten werden zowel chromogene als niet-chromogene substraten aangewend.

Na elektroforese werden voor de hydrolase-activiteiten de volgende substraten gebruikt:

1. Esterasen: α-naphthylacetaat, α-naphthylpropionaat, α-naphthyl-AS-D-acetaat, α-naphthylbutyraat en β-naphthyllauroaat

Voor het aantonen van de esterase-actieve componenten werd de methode van Markert en Hunter (1959), aangepast aan het *Astacus*-materiaal, gevolgd. Hiertoe werden de gelletjes na elektroforese 10 minuten gepreïncubeerd in fosfaatbuffer 0,2 M pH 8,0 voor het hepatopancreasextract en maagsap respectievelijk pH 7,0 voor de hemolymfe, geïncubeerd in de substraatoplossing gedurende 15 minuten bij 25°C, gefixeerd in een mengsel van drie delen ethanol en twee delen 10% azijnzuur gedurende 30 minuten bij 37°C en bewaard in 7% azijnzuur.

2. 'Alkalische' fosfatasen: Na-β-glycerofosfaat, naphthol-AS-MX-fosfaat en Na-α-naphthylfosfaat.

De substraataffiniteit van de 'alkalische' fosfatase-activiteiten ten opzichte van Na-β-glycerofosfaat werd nagegaan volgens de 'metaalzout'-methode van Gomori (1950): de gelletjes werden 15 minuten gepreïncubeerd in 0,05 M Tris-HCl-buffer pH 8,9, geïncubeerd in de substraatoplossing gedurende 15 minuten bij 25°C, gespoeld in water en nageïncubeerd gedurende 30 minuten bij 25°C in een oplossing bestaande uit 0,08 M Tris-maleaatbuffer en 0,003 M PbNO₃, pH 7,0, 1 uur zorgvuldig nagespoeld in water en gedurende 2 minuten gekleurd in 5% ammoniumsulfide-oplossing.

Voor de studie van de affiniteit ten opzichte van Na-α-naphthylfosfaat werd de simultane koppelingsmethode van Barka (1961) gevolgd: de voor-

incubatie geschiedde in 0,05 M Tris-HCl-buffer pH 8,9 gedurende 15 minuten, de substraatincubatie gedurende 15 minuten bij 25°C en tenslotte werd nagespoeld in water. Bovendien werd de simultane koppelingsmethode volgens Burstone (1958) toegepast, waarbij dezelfde voorincubatie, substraatincubatie in naphthol-AS-MX-fosfaat en nabewerking werd aangehouden.

3 'Zure' fosfatasen Na- β -glycerofosfaat, naphthol-AS-MX-fosfaat en Na- α -naphthylfosfaat

Voor het aantonen van de 'zure' fosfatase-activiteiten, met naphthol-AS-MX-fosfaat respectievelijk Na- α -naphthylfosfaat als substraten, werden dezelfde substraatmengsels als bij de 'alkalische' fosfatase gebruikt, met aanpassing van de buffer (0,05 M veronal-acetaat-buffer of 0,2 M Na-acetaat-buffer pH 5,2) en een preincubatie der gels in genoemde buffers bij 4°C.

De affiniteit ten opzichte van Na- β -glycerofosfaat werd met een gewijzigde methode volgens Gomori (1950) uitgetest: voorincubatie bij 4°C gedurende 15 minuten in acetaatbuffer pH 5,2, substraatincubatie gedurende 15 minuten bij 4°C, 1 uur naspoelen in water bij 4°C en 2 minuten nakleuren in 5% ammoniumsulphide-oplossing.

4 Amylasen gehydrolyseerd zetmeel en glycogeen

Het aantonen der amylase-activiteiten geschiedde door middel van een gewijzigde substraatfilmmethode volgens Doane (1967). Een zetmeel of glycogeen, bevattende polyacrylamidefilm, aangebracht op een glasplaat, werd op de binnenzijde van een overlans doorgesneden gelletje gelegd. Na enige tijd werd een verdunde JKI-oplossing over de polyacrylamidefilm gegoten. Op plaatsen waar de amylasen vanuit het gelletje diffundeerden, werd het substraat afgebroken, hetgeen als lichte vlekken op een donkerblauwe ondergrond zichtbaar werd.

Voor de bereiding van de polyacrylamidefilm werden, afwijkend van Doane, de volgende oplossingen, gemengd in de aangegeven verhouding, gebruikt: 1 vol a + 2 vol b + 1 vol water + 4 vol c.

a 0,005 M acetaatbuffer 5 cc 1 N azijnzuur + 0,333 g CaCl_2 + 0,46 cc TEMED opgelost in water en met 1 N NaOH op pH 5,6 gebracht en aangevuld met water tot 100 cc (voor hepatopancaas- en maagsapmateriaal) of 0,05 M Tris-HCl-buffer pH 7,0 + 0,03 M CaCl_2 + 0,23 cc TEMED per 100 cc (voor hemolymfemateriaal).

b 30,0 g acrylamide + 0,8 g BIS aangevuld met water tot 100 cc (voor hepatopancaas- en maagsapmateriaal) of 28,0 g acrylamide + 0,735 g BIS aangevuld met water tot 100 cc (voor hemolymfemateriaal).

c 3% zetmeel- of glycogeenoplossing waarin 14 mg ammoniumpersulfaat per 10 cc oplossing.

Voor de enzymtest werden de gehalveerde gelletjes voorgeïncubeerd in 0,05 M acetaatbuffer pH 5,6, waarin 0,03 M CaCl_2 , gedurende 30 minuten (voor hepatopancreas- en maagsapmonster) respectievelijk in 0,05 M Tris-HCl-buffer pH 7,0 gedurende 15 minuten (voor hemolymfe); vervolgens geïncubeerd op de substraatplaat bij 25°C gedurende 1½ uur respectievelijk 7 uur, nagekleurd met JKI (1 g J + 2 g KI per 300 cc water) en gefixeerd in azijnzuur 7%.

5. *Proteasen*: gelatine, BANA en BPNA

Proteasen werden aangetoond volgens Denucé (1969) met behulp van belichte en ontwikkelde fotografische platen (Diapositive Contrast, Agfa-Gevaert; Rodinal-ontwikkelaar). Na overvloedig spoelen in leidingwater werden de platen te drogen gezet tot ze de geschikte vochtigheidsgraad hadden bereikt. De binnenkant van de gehalveerde gelletjes werd met de gelatinelag in contact gebracht en gedurende 1½ uur bij 25°C geïncubeerd in een vochtige kamer. Daarna werden de gelletjes verwijderd en de gelatineplaat gefixeerd in 7% azijnzuur, grondig gespoeld in leidingwater en te drogen gezet.

De affiniteit van de proteasen ten opzichte van de synthetische substraten BANA en BPNA werd als volgt geteld: na elektroforese werden de gels onmiddellijk in een BANA- of BPNA-oplossing geïncubeerd gedurende een ½ uur bij 25°C (10 mg substraatoplossing in 1,5 cc N,N-dimethylformamide + 9 cc 0,05 M Tris-HCl-buffer pH 8,0); daarna werden de actieve fracties zichtbaar gemaakt met een diazoblauwoplossing (4 mg fast blue BB + 1 cc Tris-HCl-buffer pH 8,0) en gespoeld in water.

6. *Aanvullende kleurmethoden*

Als aanvullende kleuring van de gescheiden eiwitcomponenten werden de volgende methoden toegepast:

Amidozwart 10 B: na elektroforese werden de gelletjes geïncubeerd in 1% amidozwart 10 B-oplossing in 7% azijnzuur gedurende 45 minuten en vervolgens overvloedig gespoeld in 7% azijnzuur.

Hemocyanine-koperkleuring van de hemolymfe-analyses volgens Decler (1961; ongewijzigd).

Glycoproteïnekleuring volgens Maurer (1968; ongewijzigd).

Lipoproteïnekleuring volgens Ressler (1961; ongewijzigd).

D. *Studie van inhibitoren*

De behandeling van de gels met inhibitoren in verschillende concentraties vond plaats tussen voorincubatie in de aangepaste buffer en immersie in de eigenlijke substraatoplossing volgens de hierboven beschreven methoden.

De verschillende hydrolasen werden aan de volgende inhibitoren onder-

worpen:

1. Esterasen

inhibitoren: eserinesulfaat (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} M); DFP (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} M); EDTA (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} M); NaF (0,1, 10^{-2} , 10^{-3} M).

incubatietijd: 30 minuten

substraat: α -naphthylbutyraat pH 8,0/pH 7,0.

2. 'Alkalische' fosfatasen

inhibitoren: L (+) cysteïne (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} M); EDTA (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} M).

incubatietijd: 15 minuten

substraat: Na- α -naphthylfosfaat pH 9,0

3. 'Zure' fosfatasen

inhibitoren: L (+) wijnsteen zuur (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} M); NaF (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} M).

incubatietijd: 15 minuten

substraat: Na- α -naphthylfosfaat pH 5,2

4. Proteasen

inhibitoren: Trasylol (1000 KIE,* 100 KIE, 10 KIE, 1 KIE per 10 cc); SBI (5000 μ g, 500 μ g, 50 μ g, 5 μ g per 10 cc); Ovomucoïd (5000 μ g, 500 μ g, 50 μ g, 5 μ g per 10 cc); DFP (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} M); humaan serum** (1 : 10, 1 : 100); α_1 -antitrypsine (500 μ g, 50 μ g, 5 μ g per 10 cc); TPCK (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} M); TLCK (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} M); vers *Astacus*-serum (onverdund, 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000).

incubatietijd: 1 uur

substraat: gelatine

5. Amylasen

inhibitoren: CuSO_4 (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} M); CuCl_2 (10^{-3} , 10^{-4} M + 10^{-2} M ascorbinezuur); ureum (8 M).

incubatietijd: 1 uur

substraat: zetmeel

* KIE = afkorting voor de eenheid van de polyvalente runderinhibitor: 1 KIE = 0,56 ImE (int. inhibitor milli-eenheden) of 1 KIE = 1,33 TIE (trypsin inhibitor-eenheden).

** Serum van emfyseempatiënten na operatie.

3.1.3. Resultaten

3.1.3.1 Het patroon van de multiële hydrolasen in het hepatopancaas-extract

De elektroforetische analyse van de hepatopancaasextracten toont aan dat de hier onderzochte hydrolasen in multiële vorm kunnen optreden en duidelijke variaties vertonen in hun affiniteit ten opzichte van verschillende substraten

Het probleem van de identificatie van overeenstemmende componenten werd opgelost door polyacrylamidegels te halveren en in verschillende substraten te incuberen

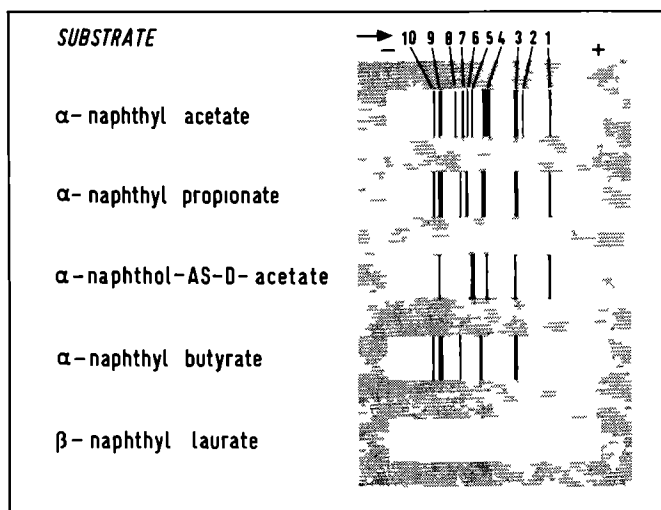


Fig 7 Substrate affinity of the hepatopancaas esterases (disc electrophoresis 7.5% acrylamide, pH 8.9, substrate incubation pH 8.0)

Fig 7 Substraataffiniteit van de hepatopancaasesterasen (disc-elektroforese 7,5% acrylamide, pH 8,9, substraatincubatie pH 8,0)

A Esterasen

Afhankelijk van het gebruikte substraat, varieert het aantal esterase-actieve eiwitcomponenten tussen 5 en 10. In het getekende zymogram (figuur 7) is de snelst lopende fractie (voor de anode) met 1 aangegeven, de traagst migrerende (aan de kathode) met 10. Alle tien banden zijn aanwezig na

incubatie in α -naphthylacetaat. De componenten 3, 4 en 9 vertonen een zeer sterke activiteit, 1, 7 en 10 worden minder intens gekleurd, 2, 5, 6 en 8 zijn slechts zeer zwak gekleurd. Na incubatie in α -naphthylpropionaat treden zeven verschillende actieve fracties op in vergelijkbare intensiteit als na incubatie in α -naphthylacetaat. Eén band (vermoedelijk nr.6) verschijnt intenser, drie componenten (2, 5 en 8) ontbreken. α -Naphthol-AS-D-acetaat wordt zeer sterk gehydrolyseerd door één band (5), vier banden (1, 3, 4 en 9) worden in gelijke mate gesplitst, vijf banden (2, 6, 7, 8 en 10) ontbreken. α -Naphthylbutyraat vertoont de grootste enzymatische hydrolyse met de fracties 3 en 9, minder sterk is de reactie met de componenten 4, 7 en 10, terwijl vijf banden (1, 2, 5, 6 en 8) geheel afwezig zijn. Geen enkele band kon worden aangetoond na incubatie in β -naphthyllauraat.

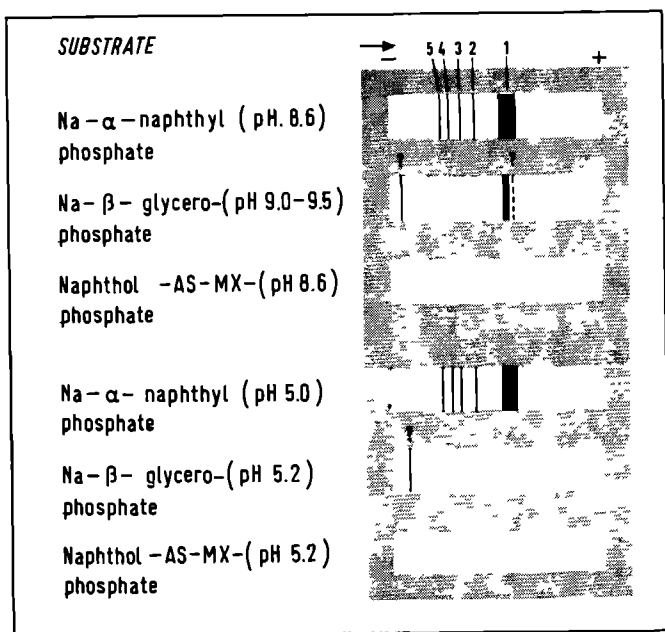


Fig.8. Substrate affinity of the hepatopancreas phosphatases (disc electrophoresis 7.5% acrylamide, pH 8.9)

Fig.8. Substraataffiniteit van de hepatopancreasfosfasaten (disc-elektroforese 7,5% acrylamide, pH 8,9)

B. 'Alkalische' en 'zure' fosfasaten

Het optreden van fosfatase-actieve eiwitfracties na elektroforese blijkt

sterk afhankelijk van het gebruikte substraat. Na incubatie in Na- α -naphthylfosfaat bedraagt het aantal banden vijf. In het getekende zymogram (figuur 8) wordt de meest anodische band (1) het sterkst gekleurd; de banden 2, 3, 4 en 5 zijn in mindere mate aantoonbaar. Opvallend is echter dat deze actieve fracties zowel na elektroforese in het zure pH-gebied (pH 5,0 – ‘zure’ fosfasaten) als in het basische pH-gebied (pH 8,6 – ‘alkalische’ fosfasaten) voorkomen. Na- β -glycerofosfaat wordt uitsluitend bij pH 9 door één fractie (1) gehydrolyseerd, vier banden (2, 3, 4 en 5) zijn niet aantoonbaar. Een traag lopende component reageert positief in beide pH-gebieden. Dit is waarschijnlijk het gevolg van de gebruikte histochemische methode (zware metalen) en moet derhalve als artefact worden beschouwd. Immers, bij incubatie zonder substraat blijft deze band aantoonbaar. Naphthol-AS-MX-fosfaat wordt noch bij pH 5,2, noch bij pH 8,6 gehydrolyseerd.

C. Amylasen

Met de contact-afdruk-methode zijn maximaal zes amylase-actieve fracties zichtbaar. In het zymogram (figuur 9) reageert de meest anodische band 1 bijzonder intens; de banden 2, 3 en 5 hebben blijkbaar een lagere activiteit; 4 en 6 zijn bijzonder zwak. Incidenteel treedt een zeer zwakke positieve component tussen de banden 5 en 6 op. Zowel glycogeen als zetmeel worden gehydrolyseerd door zes fracties in evenredige intensiteit en met dezelfde migratie-afstand.

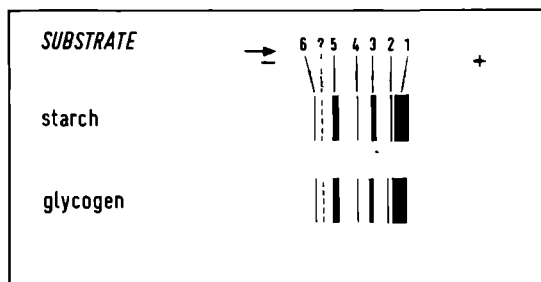


Fig.9. Substrate affinity of the hepatopaneas (and gastric juice) amylases (disc electrophoresis 7.5% acrylamide, pH 8,9, substrate incubation pH 5,6)

Fig.9. Substraataffiniteit van de hepatopaneas- (en maagsap-) amylasen (disc-elektroforese 7,5% acrylamide, pH 8,9, substraatincubatie pH 5,6)

D. Proteasen

Na elektroforese in een polyacrylamidegel met een 15%-ige acrylamideconcentratie bij pH 8,9 zijn drie sterk reagerende proteasebanden aantoon-

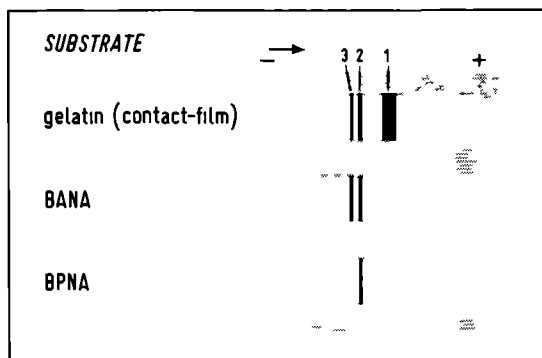


Fig 10 Substrate affinity of the hepatopancreas (and gastric juice) proteases (disc electrophoresis 15% acrylamide, pH 8.9, substrate incubation pH 8.0)

Fig 10 Substraataffiniteit van de hepatopancreas- (en maagsap-) proteasen (disc-elektroforese 15% acrylamide, pH 8,9, substraatincubatie pH 8,0)

TABEL 1

De invloed van inhibitoren op de hepatopancreasesterasen na elektroforese

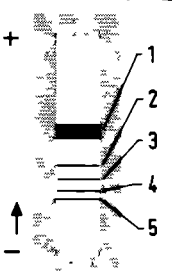
	ESERINE (sulfate)	DFP			EDTA			NaF		
	10^{-2} 10^{-3} 10^{-4}	10^{-4} 10^{-5} 10^{-6}	10^{-2} 10^{-3} 10^{-4}	0.1 10^{-2} 10^{-3}						
	(3)	(+)	-	-	+	+	(+)	-	-	-
	(4)	(+)	-	-	+	+	+	-	-	-
	(7)	+	+	-	+	+	+	-	-	-
	(9)	(+)	-	-	+	+	+	-	-	-
	(10)	(+)	-	-	+	+	+	-	-	-
substrate. α -naphthyl butyrate pH 8.0										

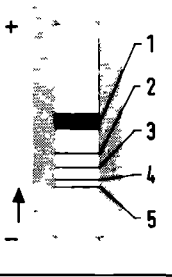
+ inhibition, - no inhibition, (+) low inhibition

baar Zoals uit figuur 10 blijkt, liggen de traagst migrerende banden 3 en 2 dicht bijeen, terwijl fractie 1 meer naar de anode en op enige afstand van de twee voorgaande gelegen is. Het optreden van de banden 1 en 2 is gecorre-

TABEL 2

De invloed van inhibitoren op de hepatopancreasfosfasen na elektroforese

	EDTA				L(+) cysteine			
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
	-	-	-	-	(+)	-	-	-
	+	+	-	-	+	(+)	(+)	(+)
	+	+	-	-	+	(+)	(+)	(+)
	+	+	-	-	+	(+)	(+)	(+)
	+	+	-	-	+	(+)	(+)	(+)
Substrate: Na- α -naphthyl phosphate pH 8.6 A								

	L(+)tartaric acid				NaF			
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Substrate: Na- α -naphthyl phosphate pH 5.0 B								

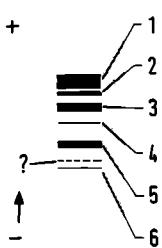
+ inhibition, - no inhibition, (+) low inhibition

leerd aan de keuze van het elektroforetisch systeem. Bij een acrylamide-concentratie van 7,5% bij pH 8,9 treden slechts twee fracties op, in lokalisatie te vergelijken met 1 en 3 in het 15% gel.

Na incubatie met de synthetische substraten BANA en BPNA kunnen slechts twee respectievelijk één fractie worden aangetoond. Overeenkomstig de migratie-afstand tussen startplaats en band stemmen deze twee banden met fractie 2 en 3 van de vorige methode overeen. Hun activiteit is echter veel lager.

TABEL 3

De invloed van inhibitoren op de hepatopancreasamylasen na elektroforese

		CuSO ₄			Cu Cl ₂ / ascorbic acid		urea
		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻⁴	8 M
	1	-	-	-	-	-	(+)
	2	-	-	-	(+)	-	+
	3	-	-	-	(+)	-	(+)
	4	+	-	-	(+)	-	-
	5	(+)	-	-	(+)	-	-
	6	+	(+)	-	+	-	-
Substrate: starch pH 7.0							

+ inhibition, - no inhibition, (+) low inhibition

Met de bedoeling de verschillende multiële vormen der onderzochte hydrolysen beter te karakteriseren, werd de invloed van inhibitoren nagegaan.

ad A. Esterasen

Tabel 1 geeft de invloed weer van de gebruikte inhibitoren van de hydrolytische activiteit der verschillende fracties ten opzichte van α -naphthylbutyraat.

Van de gebruikte inhibitoren remt alleen DFP bij concentraties van 10^{-6} tot 10^{-4} M. Sommige banden zijn meer gevoelig, andere minder. Eserinesulfaat, EDTA en NaF remmen de hydrolytische splitsing van α -naphthylbutyraat door de esterase-actieve eiwitfracties niet.

ad B. 'Zure' en 'alkalische' fosfasen

In tabel 2 is de inhiberende invloed weergegeven van L (+) cysteïne en EDTA bij pH 8,6 en van L (+) wijnsteenzuur en NaF bij pH 5,0 op de hydrolyse van Na- α -naphthylfosfaat door de verschillende fosfatase-actieve componenten.

L (+) cysteïne is de enige van de hier geteste remmers, die bij pH 8,6 de enzymatische werking van fractie 1 kon inhiberen bij een concentratie van 10^{-2} M. De andere fracties (2, 3, 4 en 5) zijn meer gevoelig voor L (+) cysteïne en EDTA bij pH 8,6. L (+) wijnsteenzuur en NaF kunnen de hydrolytische splitsing van fractie 1 bij pH 5,0 niet remmen. Wel worden de resterende fracties geremd.

TABEL 4

De invloed van inhibitoren op de hepatopancreasproteasen na elektroforese

Substrate: gelatin		TRASVL [®] (KIE)				SBI (μg)				OVOMUCOID (μg)			
		10 ³	10 ²	10	1	5.10 ³	5.10 ²	50	5	5.10 ³	5.10 ²	50	
+	1	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	
	2	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		α ₁ antitrypsin (μg)				Human serum				Astacus serum			
		5.10 ²	50	5		1:10	1:20			undil.	1:10	1:100	1:1000
	1	-	-	-		(+)	-			(+)	(+)	-	-
	2	-	-	-		(+)	-			(+)	(+)	-	-
	3	-	-	-		-	-			(+)	(+)	-	-
		DFP				TPCK				TLCM			
		10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵		10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵		10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	
	1	+	-	-		-	-	-		(+)	(+)	(+)	
	2	+	-	-		-	-	-		(+)	(+)	(+)	
	3	-	-	-		-	-	-		(+)	(+)	(+)	

+ inhibition, - no inhibition, (+) low inhibition

ad C. Amylasen

De invloed van CuSO₄, CuCl₂/ascorbinezuur en ureum op de verschillende amylasecomponenten die zetmeel splitsen, is weergegeven in tabel 3

Koperzouten blijken een remmende werking te hebben op de amylase-activiteit van de drie meest kathodische fracties; ureum daarentegen remt de drie meest anodische banden.

ad D. Proteasen

Alle onderzochte natuurlijke en synthetische protease-inhibitoren hebben een analoge inhiberende werking op de hydrolyse van gelatine door de drie elektroforetisch gescheiden componenten: fractie 1 en 2 worden minder of sterker geremd afhankelijk van de concentratie van de inhibitoroplossing. Fractie 3 blijft echter enzymatisch actief; alleen vers kreefteserum blijkt de

hydrolytische splitsing tot verdunning 1 : 10 tegen te gaan α_1 -Antitrypsine en TPCK remmen geen der drie fracties. De remming door pathologisch humaan serum bij een 1 : 10 verdunning van band 1 en 2 is zeer vaag. TLCM werkt slechts vertragend op de hydrolyse. Tabel 4 geeft een overzicht van de resultaten.

3 1.3.2. Het patroon van de multiële hydrolasen in het maagsap

A. Esterasen

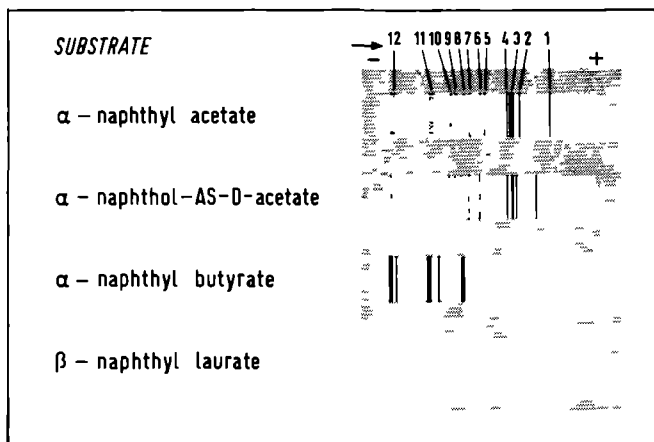


Fig.11. Substrate affinity of the gastric juice esterases (disc electrophoresis 7.5% acrylamide, pH 8.9, substrate incubation pH 8.0)

Fig.11. Substraataffiniteit van de maagsapesterasen (disc-elektroforese 7,5% acrylamide, pH 8,9, substraatinclusie pH 8,0)

Evenals in de hepatopaneas vertonen de esterase-actieve componenten een grote affiniteit voor α -naphthylacetaat. Maximaal worden twaalf banden zichtbaar, zoals het zymogram (figuur 11) aangeeft. Fractie 3 reageert zeer sterk; de banden 1, 2 en 4 vertonen een lagere maar vergelijkbare esterolytische activiteit; de overige componenten (5 t/m 12) blijven steeds zwak. De resultaten van de splitsing van α -naphthol-AS-D-acetaat zijn te vergelijken met de hydrolyse van naphthylacetaat, alhoewel minder uitgesproken; de tweede traagst migrerende component (vermoedelijk 11) is duidelijk afwezig. De aantoonbaarheid van band 5 varieert sterk. De hydrolyse van α -naphthylbutyraat vertoont een totaal afwijkend beeld in vergelijking met voorgaande zymogrammen. De intensiteit van de vijf aantoonbare banden ligt veel hoger,

ze hebben evenwel een onduidelijke relatie ten opzichte van de componenten van de hierboven beschreven zymogrammen. De esterasen van het maagsap splitsen geen hogere vetzuuresters zoals β -naphthyllauraat. In dit opzicht stemmen ze met de hepatopancreasesterasen overeen.

B. 'Zure' en 'alkalische' fosfatasen

In tegenstelling tot de fosfatase-activiteit in de hepatopancreas (figuur 8) zijn er slechts enkele fosfatase-actieve componenten in het maagsap aantoonbaar. In het zure pH-gebied (pH 5,0) blijkt alleen Na- α -naphthylfosfaat gehydrolyseerd te worden, waarbij maximaal drie banden zichtbaar worden, zoals in het zymogram (figuur 12) is aangegeven. In hun elektroforetische beweeglijkheid zijn deze fracties vergelijkbaar met de banden 1, 4 en 5 in het hepatopancreasextract, ook qua activiteit reageren ze identiek. Noch in het zure, noch in het alkalische pH-gebied worden de andere onderzochte substraten gehydrolyseerd.

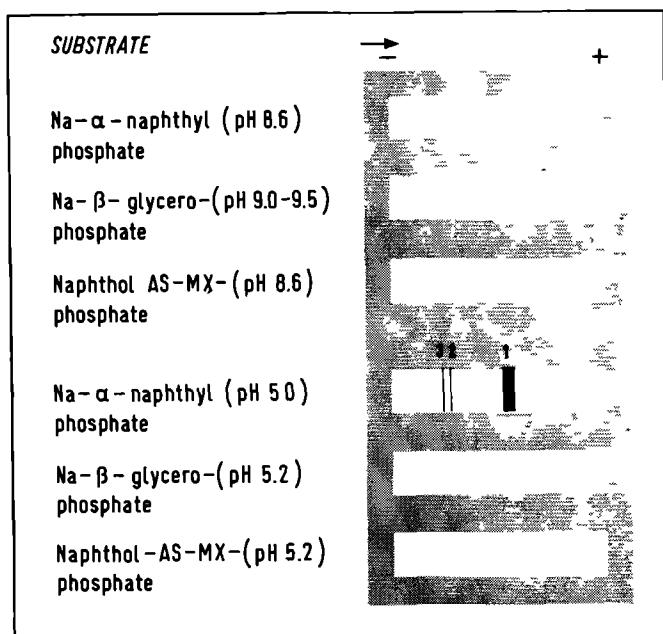


Fig.12. Substrate affinity of the gastric juice phosphatases (disc electrophoresis 7.5% acrylamide, pH 8.9)

Fig.12. Substraataffiniteit van de maagsapfosfatasen (disc-elektroforese 7,5% acrylamide, pH 8,9)

C. Amylasen

Het zymogram van de amylase-activiteit in het maagsap is identiek aan dat van de hepatopaneas. Maximaal worden zeven actieve componenten zichtbaar, waarvan één incidenteel. De snelst migrerende fractie (naar de anode) vertoont ook hier de hoogste activiteit. De hydrolytische splitsing door de andere banden is vergelijkbaar met de afbraak door de overeenkomstige amylasefracties in het hepatopaneasextract (figuur 9).

D. Proteasen

Evenals in de hepatopaneas zijn in het maagsap drie componenten met proteolytische activiteit aantoonbaar. In activiteit en elektroforetische beweeglijkheid stemmen zij met die van het hepatopaneasextract overeen. Vermoedelijk gaat het hier om dezelfde fracties (figuur 10).

3 1.3.3. Het patroon van de multiële hydrolasen in de hemolymfe

A. Esterasen

Afhankelijk van het gebruikte substraat varieert het aantal esterase-actieve fracties in de hemolymfe van één tot vijf (figuur 13). Vijf banden zijn aan-

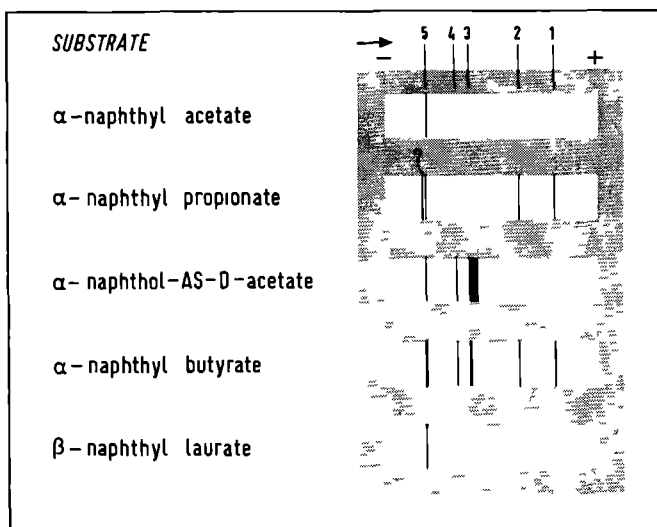


Fig 13. Substrate affinity of the hemolymph esterases (disc electrophoresis 7.0% acrylamide, pH 8.9, substrate incubation pH 7.0)

Fig.13. Substraataffiniteit van de hemolymfe-esterasen (disc-elektroforese 7,0% acrylamide, pH 8,9, substraatincubatie pH 7,0)

toonbaar na incubatie in α -naphthylbutyraat: de banden 1 en 2 liggen in het gebied van de anode; 3, 4 en 5 liggen meer kathodisch. De banden 1, 3 en 5 vertonen een relatief sterke esterase-activiteit, alhoewel in veel mindere mate dan in het hepatopancreasextract; ook band 2 en 4 zijn minder intens. α -Naphthylpropionaat wordt gehydrolyseerd door drie fracties (vermoedelijk 1, 2 en 5). Een sporadisch optredende band wordt zichtbaar aan de kathodische zijde van band 5. α -Naphthol-AS-D-acetaat wordt eveneens gesplitst door drie componenten (3, 4 en 5); fractie 3 geeft een zeer intense reactie; fracties 1 en 2 ontbreken. Na incubatie in α -naphthylacetaat en β -naphthyl-lauraat is slechts één component aantoonbaar (5).

B. 'Zure' en 'alkalische' fosfatasen

In tegenstelling tot het hepatopancreasmateriaal reageren de fosfatase-actieve proteïnefracties van de hemolymfe bij pH 8,6-9.5 en 5,0-5,2 verschillend ten opzichte van het te hydrolyseren substraat, terwijl ook het aantal multipel voorkomende banden in deze pH-gebieden uiteenloopt (figuur 14).

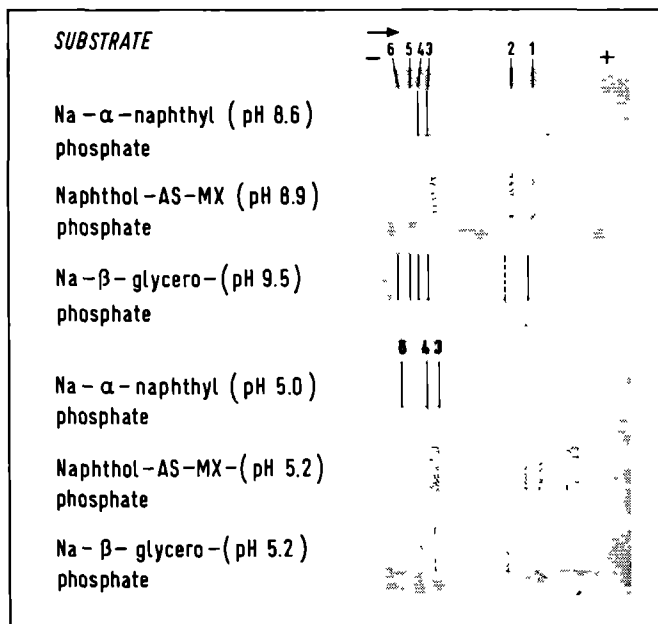


Fig.14. Substrate affinity of the hemolymph phosphatases (disc electrophoresis 7.0% acrylamide, pH 8.9)

Fig.14. Substraataffiniteit van de hemolymfefosfatasen (disc-elektroforese 7,0% acrylamide, pH 8,9)

Na- β -glycerofosfaat wordt bij pH 9,0-9,5 door zes fracties gehydrolyseerd. De intensiteit is echter veel minder in vergelijking met die van het hepatopancreasmateriaal. Bij pH 5,2 wordt Na- β -glycerofosfaat niet gehydrolyseerd ofwel sporadisch door drie fracties. Naphthol-AS-MX-fosfaat is noch bij pH 8,9 noch bij pH 5,2 te hydrolyseren; slechts zeer vaag is een drietal actieve zones aantoonbaar. Na- α -naphthylfosfaat wordt bij pH 5,0 door drie positief reagerende componenten afgebroken, welke alle tegen de kathode liggen. Bij pH 8,6 zijn slechts twee traagmigrerende fracties zichtbaar, die waarschijnlijk analoog zijn aan no.3 en 4.

C. Amylasen



Fig.15. Zymogram of the amylase activity in the hemolymph (disc electrophoresis 7.0% acrylamide, pH 8.9; substrate incubation pH 7.0)

Fig.15. Zymogram van de amylase-activiteit in de hemolymfe (disc-elektroforese 7,0% acrylamide, pH 8,9; substraatincubatie pH 7,0)

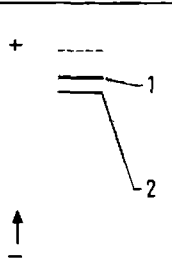
TABEL 5
De invloed van inhibitoren op de hemolymfe-esterasen na elektroforese

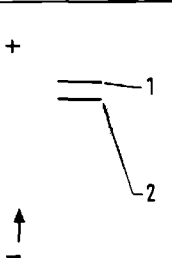
		ESERINE (sulfate)			EDTA		
		10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
+ 	1	+	+	-	+	-	-
	2	+	+	-	+	-	-
	3	+	+	-	+	-	-
	4	+	-	-	-	-	-
	5	+	-	-	-	-	-
Substrate: α -naphthyl butyrate pH 7.0							

+ inhibition, -no inhibition, (+) low inhibition

TABEL 6

De invloed van inhibitoren op de hemolymfefosfatasen na elektroforese

	L(+)tartaric acid			NaF		
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-
Substrate: Na- α -naphthyl phosphate pH 5.0 A						

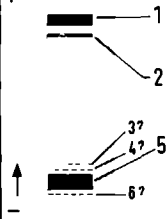
	EDTA			L(+) cysteine		
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
	-	-	-	+	-	-
	-	-	-	+	-	-
Substrate: Na- α -naphthyl phosphate pH 8.6 B						

+ inhibition, - no inhibition, (+) low inhibition

Zetmeel en glycogeen worden door verscheidene amylase-actieve componenten afgebroken. Hun aantal varieert van drie tot zes. Meestal liggen er twee duidelijk zichtbare banden dichtbij de anode (1 en 2 van het zymogram, figuur 15) en vier in de omgeving van de kathode (3, 4, 5 en 6). De fracties 1 en 5 zijn bijzonder actief, fractie 2 is minder intens; de banden 3, 4 en 6 daarentegen zijn uitermate zwak. Het sporadisch optreden van laatstgenoemde fracties is waarschijnlijk te wijten aan hun zwakke activiteit enerzijds en 'overlapping' door de hoge activiteit van band 5 anderzijds.

TABEL 7

De invloed van inhibitoren op de hemolymfe-amylasen na elektroforese

	CuSO ₄			Cu Cl ₂ / ascorbic acid		urea
	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻⁴	8 M
+				-	-	+
	-	-	-	-	-	+
	-	-	-	-	-	+
Substrate: starch pH 7.0						

+ inhibition, - no inhibition, (+) low inhibition

D. Proteasen

Proteasen zijn met de door ons toegepaste substraatfilmmethode in de hemolymfe van *Astacus leptodactylus* niet aantoonbaar.

Evenals voor de hepatopaneas werd voor de hemolymfe de invloed van enige inhibitoren nagegaan, met de bedoeling de verschillende multiële vormen der onderzochte hydrolasen beter te karakteriseren.

ad A. Esterasen

De invloed van eserinesulfaat en EDTA op de verschillende α -naphthylbutyraat splitsende componenten is weergegeven in tabel 5. Eserinesulfaat en EDTA remmen de esterase-actieve componenten 1, 2 en 3 uitsluitend in sterke concentraties (10⁻³ en 10⁻² M respectievelijk 10⁻² M); de fracties 4 en 5 worden alleen door een 10⁻² M eserinesulfaatoplossing geïnhibeerd.

ad B. 'Zure' en 'alkalische' fosfatasen

In tabel 6 is de remmende invloed weergegeven van L (+) wijnsteenzuur en NaF bij pH 5,0 en van L (+) cysteïne en EDTA bij pH 8,6 op de hydrolyse van Na- α -naphthylfosfaat door de twee fosfatase-actieve fracties. Alleen L (+) cysteïne kan beide fracties inhiberen bij een concentratie van 10⁻² M. De andere inhibitoren (L (+) wijnsteenzuur, NaF en EDTA) hebben geen remmende werking.

ad C. Amylasen

De invloed van CuSO_4 , CuCl_2 /ascorbinezuur en ureum op de amylase-componenten die zetmeel hydrolyseren, is vermeld in tabel 7. Alleen ureum (8 M) remt de drie amylasefracties.

3.1.4. Discussie

3.1.4.1. Het patroon van de multiële hydrolasen in hepatopancreasextracten en maagsap

Volgens Denucé (1967) kunnen in hepatopancreasextracten van de rivierkreeft *Orconectes virilis* zeven esterasen worden aangetoond met behulp van horizontale zetmeelelektroforese, waarbij α -naphthylbutyraat en -acetaat als substraten dienden. Gebruik makend van agar-gel-elektroforese vond Kleine (1967) slechts vier β -naphthylbutyraat splitsende banden in hepatopancreasextracten van *Astacus astacus* en slechts één actieve fractie in het maagsap van hetzelfde species. Met de door ons gebruikte disc-elektroforesemethode (acrylamide 7,5% pH 8,9) kunnen na hydrolyse van α -naphthylacetaat tien componenten en van α -naphthylbutyraat vijf banden worden aangetoond in hepatopancreasextracten respectievelijk twaalf en vijf in het maagsap. Dit grote aantal actieve componenten is waarschijnlijk niet alleen toe te schrijven aan de scheidingscapaciteit van het door ons gebruikte acrylamidegel, doch ook aan de extractie met 4% waterige n-butanol.

Het verschil in aantal actieve banden is ondanks de geringe specificiteit die men aan de esterasen toeschrijft, toch duidelijk gecorreleerd aan affiniteitsverschillen voor de toegevoegde substraten. Immers, uit de resultaten blijkt dat de esterase-eiwitten voor de toegevoegde substraten. Immers, uit de resultaten blijkt dat de esterase-actieve eiwitten hydrolyseren: acetaat > propionaat > butyraat, terwijl lauraat niet meer gehydrolyseerd wordt. De mogelijkheid dat dit verschil nauw verbonden is met de verschillende reactiesnelheden van de enzymfracties voor een der genoemde substraten wordt uitgesloten, omdat langere incubatietijden het aantal actieve fracties niet doen toenemen. Het al dan niet optreden van de verschillende banden ten opzichte van de substraten staat wellicht ook in verband met de 'drempelwaarde' die nodig is voor de precipitatie van het gekleurde diazo-naphthol-complex (b.v. van naphthol-AS-D-acetaat). In dit geval kunnen de positieve fracties toch alle vier geteste substraten splitsen, maar de reactie wordt niet zichtbaar gemaakt. Een oplossing van dit probleem is echter afhankelijk van extractie van grote hoeveelheden esterase-actieve eiwitten, die dan met elk substraat afzonderlijk op hun reactiekinetiek onderzocht dienen te worden. Toch menen we het variërend optreden van de fracties ten opzichte van de

verschillende substraten te mogen koppelen aan hun hydrolyse-activiteit. In tegenstelling tot een identieke affiniteit van hun substraten, is het elektroforetisch gedrag van de esterase-actieve componenten in maagsap en hepatopaneas uiteenlopend (voornamelijk voor de banden 5 tot en met 12 in het maagsap, respectievelijk 4 tot en met 10 voor de hepatopaneas). Vonk (1962) toonde emulgatoren aan in het maagsap van *Homarus sp.*, welke vergelijkbaar zijn met galzouten. Een mogelijke invloed der emulgatoren mag niet worden uitgesloten. De aanwezigheid van esterase-actieve componenten, afkomstig van het als voedsel toegediende runderhart-lever-mengsel, is mogelijk.

Kleine (1967) toonde met behulp van spectrofotometrische methoden aan, dat de esterase-activiteit in maagsap en hepatopaneas van *Astacus astacus* en *Cambarus affinis* ten opzichte van phenyl, naphthyl en aliphatische esters eveneens optimaal was bij C_3 - tot C_5 -esters. Ook Takahashi et al. (1964) verkregen vergelijkbare resultaten in het darm- en hepatopaneas-extract van *Panulirus japonicus*, evenals Van Weel (1960) in de hepatopaneas van *Thalamita crenata*. Vonk (1960) toonde daarentegen aan dat *Homarus sp.* en *Panulirus sp.* beter vetten verteerden dan esters van lagere alcoholen en vetzuren.

Op grond van de gevoeligheid der esterase-actieve eiwitcomponenten ten opzichte van de verschillende inhibitoren zijn de esterases in de hepatopaneas van *Astacus leptodactylus* te rangschikken in de groep der aliesterases van het classificatieschema van Augustinsson (1958, 1961). Aliesterases zijn doorgaans ongevoelig voor eserine in een concentratie $\leq 10^{-5}$ M, doch worden door organofosforcomplexen geïnhibeerd. Zij splitsen voornamelijk propionaten en butyraten. Uit de inhibitieproeven blijkt dat de hepatopaneasesterases ongevoelig zijn voor EDTA en NaF en slechts geremd worden door eserinesulfaat in een concentratie $\geq 10^{-2}$ M. Daarentegen worden ze uiterst sterk geremd door DFP (bij 10^{-6} , 10^{-5} en 10^{-4} M). Kleine (1967) onderzocht de inhibitie met colorimetrische methoden en constateerde dat hepatopaneasextracten van *Astacus astacus* NaF- en eserine-gevoelig waren, maar dat extracten van dezelfde klier bij *Cambarus affinis* veel minder geremd werden door fluoride en eserine. Een soortspecificiteit is derhalve voor de esterase-activiteit in de hepatopaneas niet uitgesloten.

Het optreden van vijf fosfatase-actieve eiwitfracties in de hepatopaneas, met polyacrylamide als scheidingsmedium en α -naphthylfosfaat (pH 8,5) als substraat, stemt overeen met de gegevens van Denucé (1967), die met behulp van zetmeelektroforese en met hetzelfde substraat eveneens twee tot vijf (alkalische) fosfatasebanden aantoonde.

Het verschil in affiniteit tussen de substraten Na- α -naphthylfosfaat (vijf banden), Na- β -glycerofosfaat (één band) en naphthol-AS-MX-fosfaat (geen

banden) bij pH 8,6-9,0 wijkt evenwel af van de resultaten van Denucé (1967), die bij gebruik van naphthol-AS-MX-fosfaat ook twee tot vijf fracties vond. Dit grote contrast tussen de verschillende zymogrammen is bijzonder opvallend, daar fosfatasen over het algemeen niet specifiek zijn ten opzichte van hun substraten. Onderscheid in de substraataffiniteit van de fosfatasen in diverse weefsels is mogelijk. Een soortgelijke differentiatie van de verschillende actieve fracties binnen eenzelfde weefsel blijkt uiterst twijfelachtig (Nisselbaum et al. 1961). Mogelijk zijn de uiteenlopende resultaten te wijten aan de gevoeligheid van de methode en niet aan substraatspecificiteit. Hunter en Burstone (1960) maakten dezelfde bezwaren naar aanleiding van hun resultaten met esterasen in lever en nier van de muis. Daarbij komt ook nog het verschil in werkingsmechanisme van de gebruikte histochemische reacties (de hydrolyse van Na- β -glycerofosfaat wordt zichtbaar gemaakt door de 'zwarte metalen'-methode van Gomori en naphthol-AS-MX-fosfaat via de simultane afsplitsing door het enzym en koppeling aan het diazoniumzout).

Na incubatie van de drie uitgeteste substraten in het zure pH-gebied (pH 5,0-5,2), met het doel 'zure' fosfatase-actieve eiwitcomponenten aan te tonen, geeft het zymogram hetzelfde patroon als in het alkalische gebied (pH 8,6-9,0). De vraag rijst daarbij: hebben deze fosfatase-actieve proteïnen twee activiteitsbereiken, afhankelijk van het pH-gebied? In deel 3.2 zal hierop nader worden ingegaan. McWhinnie en Kirchenberg (1966) toonden in een hepatopancreashomogenaat van *Orconectes virilis* twee enzymen aan met activiteitspieken bij pH 6,8-7,3 respectievelijk 8,0-8,5.

De fosfatase-activiteit in het maagsap is in vergelijking met de hepatopancreas laag en beperkt tot het zure pH-gebied. Cook et al. (1969), die na scheiding met behulp van zetmeelelektroforese zure fosfatasen in het middendarmsecrēt van *Periplaneta americana* aantoonde, meende, evenals Couch en Mills (1968), dat deze enzymen bij lysis van de autofage vacuolen en lysosomen uit het middendarmepitheel van de kakkerlak vrijkomen.

De remmende invloed, die EDTA en L (+) cysteïne bij hoge concentraties uitoefenen op de verschillende fosfatasen in het hepatopancreasextract bij pH 8,6, is te vergelijken met de werking van beide inhibitoren op de alkalische fosfatase-activiteiten in de rattendarm: EDTA (10^{-2} M) remt sterk de β -glycerofosfatasen in lever en darm bij pH 8,6 (Di Bella et al. 1963). Fishman et al. (1962) toonden de specifieke inhibitie aan door bepaalde aminozuren van alkalische fosfatasen in de darm, in tegenstelling tot die in lever, bot, long en nier.

In het zure pH-gebied (pH 5,0) gaat alleen een inhiberende werking uit van L (+) wijnsteenzuur (10^{-2} M). Uit de gegevens van Abul-Fadl (1949) blijkt dat 0,01 M wijnsteenzuur de zure fosfatase-activiteit van de prostaatklier volledig inactieveert.

In het algemeen is de beoordeling van de specifieke invloed van de inhibitoren op de fosfatase-activiteit nog gebrekkig. Bovendien is op grond van de minimale remming van fractie 1 een betere chemische karakterisering van de fosfatase-actieve banden, die wij bij de hepatopancreas van *Astacus leptodactylus* beschreven, niet mogelijk.

De Villez (1965) vond met behulp van preparatieve acrylamidegel-elektroforese drie proteasen in het maagsap van *Orconectes virilis*. Herbold et al. (1971) vonden in het maagsap van *Carcinus maenas* vier trypsine-achtige actieve componenten en een uit vijf componenten bestaand laag molecuulair protease. Pfeleiderer et al. (1967, 1969) scheidden kolomchromatografisch een protease met MG 1100 van een trypsine-achtige fractie in het maagsap van *Astacus fluviatilis*. Na disc-elektroforese (15% acrylamide pH 8,9) werd deze laatste fractie gescheiden in twee componenten. Met behulp van disc-elektroforese (15% acrylamide, pH 8,9) konden door ons in het hepatopancreasextract en maagsap van *Astacus leptodactylus* drie fracties met protease-activiteit worden aangetoond, die alle naar de anode migreren. Opgemerkt dient te worden dat rundertrypsine bij een alkalische pH naar de kathode migreert. Dit verschijnsel werd ook geconstateerd door Herbold et al. (1971) en Pfeleiderer (1969).

De remmende werking van de verschillende uitgeteste natuurlijke en synthetische inhibitoren toont duidelijk het trypsine-achtige karakter van de fracties 1 en 2 aan. Een kwalitatief verschil ten opzichte van de inhibitoren kon niet worden vastgesteld. Daarentegen werd band 3 door geen van de gebruikte protease-inhibitoren geremd. TPCK, een specifieke chymotrypsine-remmer, heeft op geen enkele fractie invloed. Dit onderstreept duidelijk de nauwe verwantschap met rundertrypsine en niet met chymotrypsine. Nochtans wijst een afwijkende elektroforetische beweeglijkheid op een mogelijk verschil in eiwitstructuur of lading. Kleine (1967) en Pfeleiderer (1967) verkregen vergelijkbare resultaten bij *Astacus astacus* en *Cambarus affinis* respectievelijk *Astacus fluviatilis*, met behulp van inhibitieproeven gecombineerd met spectrofotometrische technieken.

Vers serum van de rivierkreeft remt zowel de protease-activiteit van fractie 3 als van 1 en 2. Over de aanwezigheid van natuurlijke protease-inhibitoren in het serum van Crustacea is niets bekend. Verder onderzoek dienaangaande is wenselijk.

Algemeen wordt aanvaard dat in het verteringssap van alle Crustacea een uiterst actief amylase voorkomt. Blandamer en Beechey (1964, 1966) vermelden een α -amylase, terwijl Vonk (1960) het bestaan van een β -amylase verdedigt. Verder toonden ook Fingerman et al. (1967), Kooiman (1964) en Vonk (1937) amylase-activiteiten aan bij *Procambarus clarkii*, respectievelijk *Astacus fluviatilis*, *Astacus sp.* en *Panulirus japonicus*. Multipele vormen van

Crustaceen-amylasen worden in de literatuur niet vermeld. Met behulp van de contact-afdruk-methode konden wij na disc-elektroforese (acrylamide 7,5%, pH 8,9) zes actieve fracties aantonen, die zowel zetmeel als glycogeen hydrolyseren. Uit inhibitieproeven blijkt dat kopercomplexen en ureum selectief remmend werken op de amylase-activiteiten. Rowe en Weill (1962) vermelden dat koperionen in aanwezigheid van ascorbinezuur een sterke inhibitie uitoefenen op β -amylase, terwijl Toralballa et al. (1967) de remmende invloed van ureum op kristallijn α -amylase uit varkenspancreas bestudeerden. Derhalve rijst het vermoeden dat zowel α - als β -amylase in het hepatopancreasextract van *Astacus leptodactylus* aanwezig zijn. Een nadere specificatie van de amylase-activiteit bij Crustacea wordt in de literatuur niet gegeven. Applebaum et al. (1961, 1964) bestudeerden de amylase-activiteit in de middendarm van *Tenebrio molitor*, doch kwamen na toediening van inhibitoren evenmin tot een definitieve uitspraak met betrekking tot α - en β -amylase.

3.1.4.2 Het patroon van de multiële hydrolasen in de hemolymfe

Djangmah (1970) toonde in de hemolymfe van *Crangon vulgaris* twee en incidenteel vier esterase-actieve fracties aan met behulp van agar-elektroforese. Na hydrolyse van α - en β -naphthylacetaat werden twee diffuse esterase-actieve zones zichtbaar, bij incubatie in naphthol-AS-acetaat verschenen dezelfde banden, echter minder intens. Gebruik makend van acrylamide-disc-elektroforese konden wij minimaal één en maximaal vijf positief reagerende fracties aantonen, afhankelijk van het gebruikte substraat. Na hydrolyse van α -naphthylacetaat en β -naphthyllauraat werd slechts band 5 gekleurd, daarentegen konden drie α -naphthol-AS-D-acetaat-, drie tot vier α -naphthylpropionaat- en vijf α -naphthylbutyraat-splitsende fracties zichtbaar worden gemaakt.

Incubatie van de gels in eserinesulfaat- of EDTA-oplossingen had slechts effect bij hoge concentraties. De esterase-actieve componenten in de hemolymfe van *Astacus* kunnen eerder onder de aliesterasen dan onder de aryl- of cholinesterasen worden gerangschikt, op grond van de genoemde inhibitiewerking en hun voorkeuraffiniteit voor propionaten en butyraten.

Voor de fosfatase-activiteit in de hemolymfe van *Astacus* zijn meerdere fracties verantwoordelijk. Na- α -naphthylfosfaat wordt gehydrolyseerd door twee componenten in een alkalisch en door drie in een zuur milieu. Waarschijnlijk zijn de 'zure' fosfatasefracties 3 en 4 identiek aan de 'alkalische' fracties 1 en 2. Een analoog verschijnsel werd niet alleen door ons in de hepatopancreas van *Astacus leptodactylus* geconstateerd, maar eveneens in de antennale klier ('green gland') van *Pacifastacus leniusculus* door Fuller en Owczarzak (1967). Bij de naphthol-AS-MX-fosfaatsplitsing zijn slechts drie

(bij pH 8,9) tot vier (bij pH 5,0) vage banden aantoonbaar. In het basisch pH-gebied worden bij de hydrolyse van Na- β -glycerofosfaat naast fractie 2 en 3 nog drie of vier nieuwe componenten zichtbaar. In het zure pH-gebied worden incidenteel drie vage banden aangetoond.

In de hemolymfe werd de fosfatase-activiteit uitsluitend door 10^{-2} M L (+) cysteïne geremd. In dit opzicht zijn de fosfasen in de hemolymfe te vergelijken met die van de hepatopaneas. Ook bij vertebraten gedragen de serumfosfasen zich op eenzelfde wijze als de darmfosfasen ten opzichte van inhibitoren.

Met de contact-film-methode konden na disc-elektroforese maximaal zes, doch in de regel slechts drie duidelijke amylase-actieve componenten worden aangetoond bij *Astacus leptodactylus*. Horn en Kerr (1969) identificeerden één amylase-actieve band in de hemolymfe van *Callinectes sapidus* na zet-meelelektroforese. Op basis van de inhibitieproeven behoren de amylase-fracties in de hemolymfe tot de α -amylasen.

3.2. NADERE KARAKTERISERING VAN DE FOSFATASE-ACTIVITEIT IN HEPATOPANCREASEXTRACTEN

3.2.1. Inleiding

Bij *Pacifastacus leniusculus* werden door Fuller en Owczarzak (1967) zure en alkalische fosfatase-activiteiten aangetoond in granula en borstelzoom van de cellen in de 'groene' klier. Het gelijktijdig optreden van deze activiteiten constateerden wij rondom de calcosferieten en in de borstelzoom der R-cellen in de hepatopaneasubuli bij *Astacus leptodactylus* (zie 2.1.). Na disc-elektroforese werden in de fosfatasezymogrammen van hepatopaneas-extracten dezelfde actieve fracties aangetoond in het zure (pH 5,0) en basische pH-gebied (pH 8,6) (zie 3.1.3.1.). Deze resultaten suggereerden dat zure en alkalische fosfasen in hetzelfde cellulaire gebied (b.v. de borstelzoom) werkzaam zijn. Het is echter niet uitgesloten dat de positieve reacties te wijten zijn aan de activiteiten van één enzym over een breed pH-gebied. McWhinnie en Kirkenberg (1966) toonden fosfasen aan in hepatopaneashomogenaten van *Orconectes virilis* met twee activiteitsmaxima bij pH 6,8-7,3 respectievelijk pH 8,0-8,5.

In het hiernavolgende gedeelte wordt nader ingegaan op:

- a) de fractionering van de fosfasen in het hepatopaneasmateriaal;
- b) het pH-activiteitsverloop van de gefractioneerde fosfasen.

3.2.2. Materiaal en methoden

A. Fractionering van de fosfasen

Voor de fractionering werden hepatopancreasextracten van regelmatig gevoede kreeften in vervellingsstadium C gebruikt. Bijzonderheden over de enzymextractie met n-butanol werden beschreven in 3.1.2.

Voor chromatografie op Sephadex G-200-kolommen werd het dextran gel toe bereid volgens Flodin (1962). Gelfiltratie der fosfasen geschiedde volgens Estborn (1964): voor de alkalische fosfasen werd de kolom in evenwicht gebracht met 0,1 M Tris-HCl-buffer pH 8,0, bevattende 1 M NaCl; voor de zure fosfasen met 0,1 M citraatbuffer pH 5,5, bevattende 1 M NaCl. De eigenschappen van de gebruikte Sephadex G-200-kolommen worden hieronder aangegeven:

	pH 8,0	pH 5,5
kolomgrootte	2,5 x 40 cm	2,5 x 40 cm
V_t (totaal bedvolume)	196 cc	196 cc
V_o (dood volume)	55 cc	60 cc
V_i (binnenvolume; $V_t - V_o - V_g$)	134,6 cc	129,6 cc
V_g (gelmatrixvolume)*	6,4 cc	6,4 cc

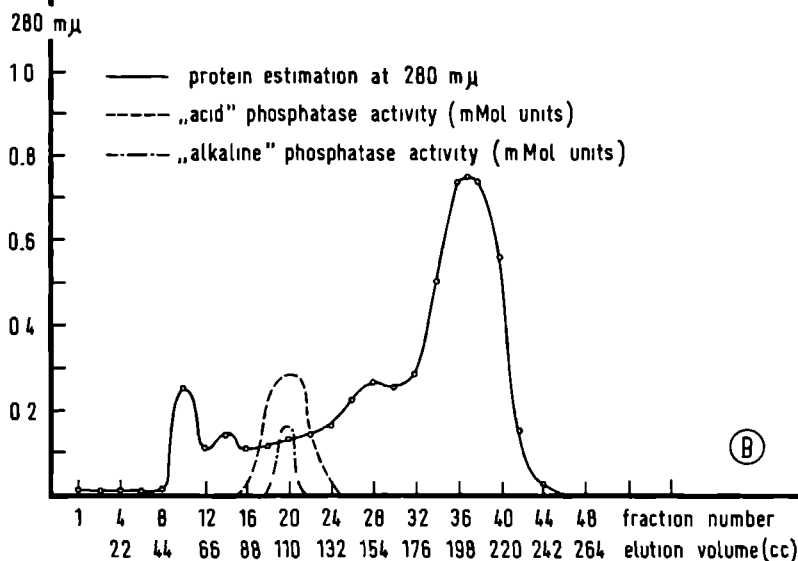
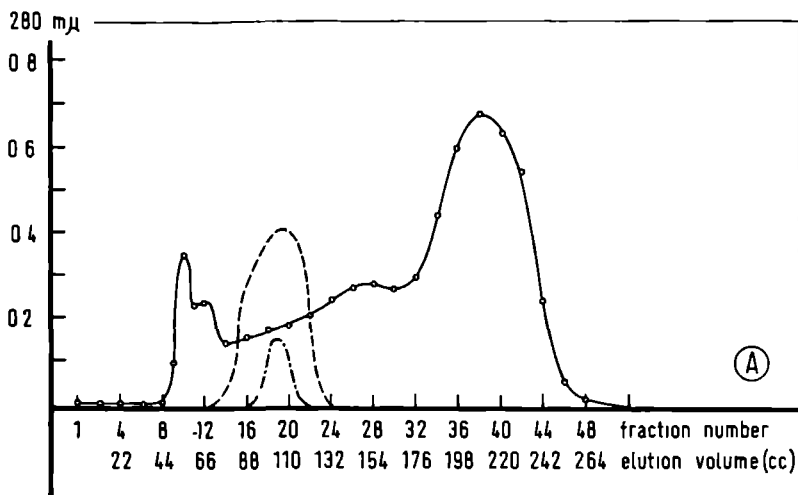
* V_g bedraagt 3,3% van V_t voor Sephadex G-200 (Pharmacia-firmagegevens).

Afhankelijk van het eiwitgehalte van het te fractioneren hepatopancreas-extract, werd 3–3,5 cc (overeenkomend met ± 36 mg eiwit) op de kolom gebracht en na indringen in het gelbed met de desbetreffende equilibratie-buffer geëluëerd. Het eluaat werd met behulp van een LKB UltraRac Fraction Collector over een groot aantal fracties van elk 5,5 cc (of 5,0 cc) verdeeld (druppeltelling). Hierbij dient te worden opgemerkt dat de druppelgrootte afnam naargelang de fractionering vorderde, zodat het fractievolume tot 5 cc daalde. Verondersteld wordt dat de 'galachtige' verbindingen, die Vonk (1964) in het verteringssap van de rivierkreeft aantoonde, als emulgatoren werkzaam zijn.

De proteïneconcentraties werden met een ultraviolet absorptiemeter (LKB Uvicord II) bij 280 m μ gemeten. Na selectie van de fosfasen bevattende fracties met behulp van de Auxotab-methode (Plantevin et al. 1968) werden de fosfatase-activiteiten spectrofotometrisch bepaald volgens Bessey et al. (1946) met p-nitrophenylfosfaat als substraat (zie 3.3.2.).

B. pH-activiteitscurve van de hepatopancreasfosfasen

Fosfatasefracties, verkregen door gelchromatografie, werden gebruikt om het pH-activiteitsverloop na te gaan. Deze fosfatase-actieve eluaten werden



(A) elution buffer 0.1M citrate pH 5.6 (+ 1M NaCl)

(B) elution buffer 0.1M Tris/HCl pH 8.0 (+ 1M NaCl)

Fig 16 Chromatography on Sephadex G-200 columns of hepatopancreas extract and estimation of the phosphatase activity

Fig 16 Chromatografische scheiding van hepatopancreasextract over Sephadex G-200 kolommen en bepaling van de fosfatase-activiteit

verzameld en geconcentreerd door ultrafiltratie met een Amicon 'Diaflo' PM 10 membraan. De fosfatase-activiteit werd spectrofotometrisch bepaald in het pH-gebied 4,0-10,6. Citraatbuffer werd gebruikt in pH-gebied 4,0-6,4; universeelbuffer volgens Johnson-Lindsay in pH-gebied 6,8-8,0 en glycinebuffer in pH-gebied 8,4-10,6.

3.2.3. Resultaten

A. Gelfiltratie

De resultaten van de gelfiltratie zijn weergegeven in figuur 16 A en B. In 'zure' en in 'alkalische' kolommen komt de fosfatase-activiteit van het hepatopancreasmateriaal slechts in één activiteitspiek voor, waarvan de K_d -waarde, $\left(K_d = \frac{V_e - V_o}{V_i} \right)$ nagenoeg identiek is. Bij pH 5,2 varieert deze verdelingscoëfficiënt van 0,38 tot 0,30; bij pH 8,0 van 0,36 tot 0,29.

Bovendien blijkt dat de fosfatase-activiteit, aanwezig in de eluaten en behorend bij genoemde activiteitspiek, in een breed pH-gebied werkzaam is, daar p-nitrophenylfosfaat zowel in een zuur (pH 4,8) als een basisch milieu (pH 10,5) gehydrolyseerd wordt.

B. pH-activiteitscurve

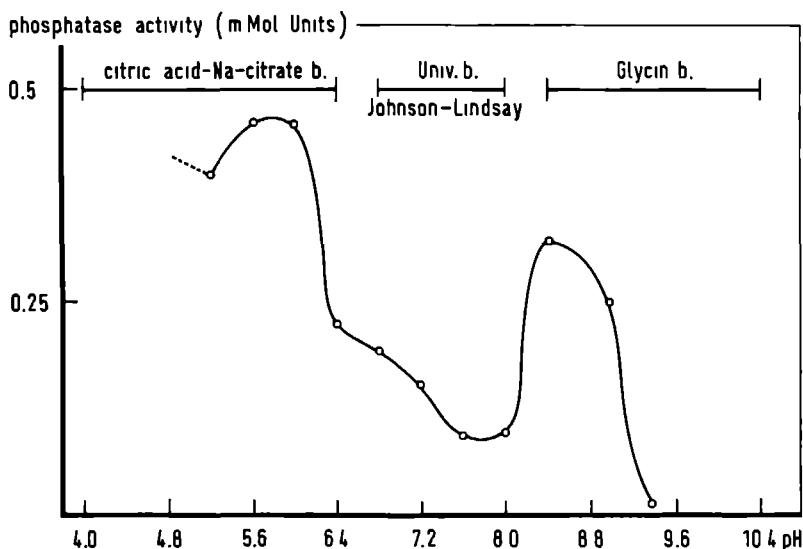


Fig.17. pH Curve of the eluted and concentrated phosphatase fractions

Fig.17. pH-Kurve van de geëluëerde en geconcentreerde fosfatase-fracties

Een verder onderzoek van het pH-activiteitsverloop van bovengenoemde eluaten toont aan, dat in de pH-curve twee van elkaar gescheiden optima voorkomen. Terwijl in het zure pH-gebied het optimum tussen pH 5,6 en 6,0 ligt, verschijnt het tweede optimum in het alkalische pH-gebied tussen 8,4 en 8,8.

Het pH-activiteitsverloop is aangegeven in figuur 17.

3.2.4. Discussie

In extracten van de hepatopaneas van *Astacus leptodactylus* kan slechts één fosfatase-activiteitspiek worden aangetoond met behulp van gelfiltratie in Sephadex G-200. Dit fosfatase kon op grond van zijn molecuulgrootte van begeleidende proteïnen (tenminste twee absorptiemaxima bij 280 m μ) worden gescheiden. De hydrolyse van p-nitrophenylfosfaat in zuur en alkalisch milieu bevestigt de werking van het enzym in een breed pH-gebied waarin twee gescheiden activiteitspieken bij pH 5,6-6,0 en 8,4-8,8 optreden. Hierbij dient echter te worden vermeld dat het pH-effect op de fosfatase-activiteit werd onderzocht zonder rekening te houden met de maximale reactiesnelheid (V) en de Michaëlisconstante (K_m) voor elke pH-waarde.

De hierboven vermelde resultaten bevestigen de gegevens, die bij het histochemisch onderzoek (zie 2.1.) en bij de disc-elektroforetische analyse (zie 3.1.3.1.) van de fosfatase-activiteiten in het zure en alkalische pH-gebied werden gevonden. Daarenboven wijzen zij in dezelfde richting als de gegevens van McWhinnie en Kirchenberg (1966), die in hepatopaneashomogenaten van *Orconectes virilis* eveneens twee activiteitsmaxima aantoonde (pH 6,8-7,3 en 8,0-8,5).

Het gebruik van de termen 'zure' en 'alkalische' fosfasen, zoals voorgesteld in 2.1., is op grond van het voorgaande volkomen gerechtvaardigd.

3.3. KWANTIFICEREN VAN DE ENZYMACTIVITEITEN MET BEHULP VAN BIOCHEMISCHE ANALYSEMETHODEN

3.3.1. Inleiding

Zoals uit paragraaf 3.1. blijkt, kunnen verschillende 'molecular forms' van de onderzochte hydrolasen worden aangetoond met de zymogrammethode, welke voor het eerst door Hunter en Markert (1959) vanuit de histochemie bij elektroforetische scheidingstechnieken werd toegepast. De hoeveelheid kleurstof, die onder invloed van de enzymatische activiteit ontstaat, kan ofwel door elutie en navolgende fotometrische meting ofwel direct foto-

metrisch ('scanning') worden achterhaald. Ofschoon met deze methode een kwantitatieve benadering van elke elektroforetisch gescheiden fractie mogelijk is, gaven wij er de voorkeur aan alleen biochemische analysemethoden ter kwantificering van de verschillende hydrolase-activiteiten toe te passen.

Onderstaand worden de gebruikte bepalingen, aangepast aan het *Astacus*-materiaal, kort beschreven, terwijl ook de statistische verwerking van de gegevens wordt vermeld.

3.3.2. Materiaal en methoden

A. Preparatie en voorbereiding van het weefsel voor biochemische analyse

1. Hemolymfe

Voor de bepaling van de hydrolase-activiteiten werd het serum gebruikt, dat verkregen werd na centrifugatie van de afgetapte hemolymfe bij 2000 g en 4°C.

2. Hepatopaneas

Voor de analyse van de enzymatische activiteiten in het hepatopaneas-weefsel werden n-butanolextracten gebruikt. Hiertoe werd het weefsel, na 1 minuut spoelen in koude fysiologische zoutoplossing (naar Andrews 1967) en bepaling van het natgewicht, gedurende 1 minuut gehomogeniseerd in een dubbel volume 4% n-butanoloplossing, bevattende 0,9% NaCl bij 4°C. Na 1 uur werd dit homogenaat gedurende 10 minuten gecentrifugeerd bij 6000 g, waarbij het materiaal zich in drie lagen scheidde. Hiervan werden de lipidehoudende oppervlaktelaag evenals het precipitaat verwijderd, terwijl de heldergroene waterige laag voor de enzymbepalingen werd gebruikt.

B. Biochemische methoden

1. Bepaling van de fosfatase-activiteit

Met p-nitrophenylfosfaat als substraat werd de fosfatase-activiteit bepaald (Bessey et al. 1946). Deze activiteit is per tijdseenheid evenredig aan het vrijgekomen p-nitrophenol. Eén fosfatase-eenheid van Bessey et al. stemt overeen met deze enzymoplossing, die in 1 uur bij 37°C 1 mMol p-nitrophenol afsplitst. Deze eenheid wordt ook wel mMol-eenheid genoemd. Voor de hier beschreven experimenten werden de fosfatase-activiteiten uitgedrukt in: mMol 'zure' fosfatase-eenheden respectievelijk mMol 'alkalische' fosfatase-eenheden. Ter omrekening in internationale eenheden (mU/cc) dienen de mMol 'zure' fosfatase-eenheden met 8,3 en de mMol 'alkalische' fosfa-

tase-eenheden met 18 te worden vermenigvuldigd (Rauen 1964).

2. Bepaling van de esterase-activiteit

Voor de bepaling van de esterase-activiteit werd de methode van Liberti (1968) toegepast, met p-nitrophenylpropionaat als substraat. De afsplitsing van p-nitrophenol verloopt recht evenredig aan de tijd, zodat deze per minuut kan worden berekend. Door extrapolatie van de afgelezen extinctie op een ijkcurve, waarin de extinctie ten opzichte van de concentratie p-nitrophenol is uitgezet, kan de hoeveelheid p-nitrophenol (mMol) worden bepaald, die gedurende de enzymreactie vrijkomt. Alle esterase-activiteiten, beschreven voor de verschillende experimenten, werden uitgedrukt in $\times 10^{-6}$ mMol p-nitrophenol/minuut/50 μ l monster.

3. Bepaling van de amylasen

a. Amylase-activiteit in de hepatopancreas

Ter bepaling van de amylase-activiteit in hepatopancreasextracten werd de methode van Rinderknecht et al. (1967) gebruikt, met amylose remazolbril- liant blue R (RBB) als substraat. Daar bij een enzymactiviteit tussen 0 en 450 U/100 cc de optische densiteit lineair verloopt, kon met behulp van een ijklijn de amylase-activiteit in U/100 cc worden berekend.

b. Amylase-activiteit in de hemolymfe

Street en Close (1956) beschreven een methode waarbij men de enzym- oplossing (of monster) gedurende 15 minuten laat inwerken op amylose, waarna door toevoegen van een JKI-oplossing de blauwkleuring als parameter voor de amylase-activiteit wordt gebruikt. Volgens Peralta en Reinhold (1955) komen in een 100 cc extractoplossing 100 Street-Close eenheden voor wanneer 0,1 cc (van 1 : 100 verdunde oplossing) bij pH 7,0 en 37°C in 15 minuten 2 mg amylose hydrolyseert. De amylase-activiteit in de verschil- lende experimenten werd in Street-Close eenheden/100 cc extract uitge- drukt.

Met het oog op omrekening in mU/cc dient te worden vermeld dat 1 Street-Close eenheid gelijk is aan 8200 mU.

4. Bepaling van de protease-activiteit (in hepatopancreasextracten)

Anson (1939) beschreef een methode waarbij gedenatureerd eiwit (hemo- globine) onder inwerking van proteasen gehydrolyseerd wordt, waarna het tyrosine- en tryptofaangehalte (mMol) spectrofotometrisch volgens Folin en Ciocalteu (1927) wordt gemeten. Daar de optische densiteit lineair verloopt met het tyrosinegehalte, kan met behulp van een ijklijn uit de afgelezen extinctiewaarde de concentratie van het afgesplitste tyrosine (mMol) bepaald worden per testvolume, dat men als relatieve maat voor de totale protease-

activiteit kan beschouwen

De testuitvoeringen van de verschillende methoden worden aan het einde van dit hoofdstuk beknopt vermeld

3.3.3 Statistische verwerking van de resultaten

De gegevens van de enzymatische activiteiten, verkregen volgens de hierboven beschreven methoden, werden statistisch getoetst. Daar bij enige experimenten niet duidelijk was of de getallengroepen aan de normale verdeling voldeden, werden in die gevallen ter controle twee toetsen toegepast, namelijk

a De t-toets van Student voor twee steekproeven

Met deze toets kan worden nagegaan of de steekproefgemiddelden significant verschillen. Hij mag alleen dan worden toegepast als kan worden aangenomen dat de betreffende grootheden normaal verdeeld zijn met gelijke standaardafwijking. De tweezijdige overschrijdingskans P_{t_2} wordt bepaald met behulp van de t-verdeling van Student.

b De toets van Wilcoxon voor twee steekproeven

Met deze toets kan worden nagegaan of de waarnemingen in een van beide steekproeven significant groter zijn. De overschrijdingskans P_w wordt zoveel mogelijk bepaald met exacte tabellen en in andere gevallen benaderd met behulp van de normale verdeling.

c Bij vergelijking van gegevens van meerdere steekproeven werd de enkelvoudige variantie-analyse als statistische toets aangewend. Met deze toets kan worden nagegaan of de gemiddelden van een aantal steekproeven significant verschillen. De overschrijdingskans wordt bepaald met behulp van de F-verdeling van Fisher.

Voor alle toetsen werd het resultaat uitgedrukt als niet significant, n.s., bij een overschrijdingskans $P \geq 10\%$, aanwijzing voor een relatie of verschil, (*), bij $5\% \leq P < 10\%$, significant, *, bij $0,1\% \leq P < 5\%$, zeer significant, **, bij $P < 0,1\%$.

Samenvatting van de testuitvoeringen van de verschillende methoden

a 'zure' fosfatasen		testuitvoering			
golflengte	400 mμ	1,0 cc	citraatbuffer pH 4,8	50	mM
cuvet φ	1 cm		p-nitrophenylfosfaat (Na-zout)	5,5	mM
temperatuur	37°C		<i>5 a 10 minuten voorincuberen bij 37°C en dan toevoegen</i>		
		0,2 cc	monster (+ enzym)		
			<i>1 uur incuberen bij 37°C en reactie stopzetten met</i>		
		4,0 cc	NaOH	0,1	N
'alkalische' fosfatasen		testuitvoering			
golflengte	400 mμ	1,0 cc	glycinebuffer pH 10,5	50	mM
cuvet φ	1 cm		(+ 1 mM MgCl ₂)		
temperatuur	37°C		p-nitrophenylfosfaat (Na-zout)	5,5	mM
			<i>5 à 10 minuten voorincuberen bij 37°C en dan toevoegen</i>		
		0,1 cc	monster (+ enzym)		
			<i>1 uur incuberen bij 37°C en reactie stopzetten met</i>		
		10 cc	NaOH	0,02	N
b esterasen		testuitvoering			
golflengte	405 mμ	3,0 cc	fosfaatbuffer pH 7,0	100	mM
cuvet φ	1 cm		p-nitrophenylpropionaat	0,218	mM
temperatuur	23,5°C		<i>bij 23,5°C voorincuberen en dan toevoegen</i>		
		0,05 cc	monster (+ enzym)		
			<i>4 minuten incuberen bij 23,5°C en reactieverloop registreren</i>		
c amylasen		testuitvoering			
<i>(in hepatopancreas)</i>					
golflengte	595 mμ	4,5 cc	Na-fosfaatbuffer pH 7,0	20	mM
cuvet φ	1 cm		(+ 50 mM NaCl)		
temperatuur	37°C		RBB-suspensie	2%	
			<i>15 minuten incuberen bij 37°C en dan toevoegen</i>		
		0,5 cc	monster (+ enzym)		
			<i>15 minuten incuberen bij 37°C en reactie stopzetten met</i>		
		2,0 cc	verdund azijnzuur		
			<i>(toevoegen tot pH 4,0 en filtreren)</i>		

amylasen**testuitvoering***(in hemolymfe)*

golflengte	620 mμ	5,0 cc	fosfaatbuffer pH 7,0	20 mM
cuvet φ	1 cm	2,0 cc	amylose	0,1%
temperatuur	37°C		HCl	0,01 N

3 minuten voorincuberen bij 37°C en dan toevoegen

1,0 cc monster (+ enzym)

15 minuten incuberen bij 37°C en na toevoegen van

± 80,0 cc aqua dest

4,0 cc JKI-oplossing 0,01 N

tot 100 cc aanlengen met aqua dest

d proteasen**testuitvoering***(in hepatopancreas)*

golflengte 750 mμ (Zeiss)

cuvet φ 1 cm

temperatuur 25°C

1. enzymatische reactie.

5,0 cc substraat (hemoglobine) 2%

oplossing voorincuberen bij 25°C, dan toevoegen

1,0 cc monster (+ enzym)

10 minuten incuberen bij 25°C, 30 minuten bij kamertemperatuur laten staan en filtreren

2. kleurreactie

5,0 cc filtraat

10,0 cc NaOH 0,5 N

3,0 cc phenolreagens (1 : 3 verdund)

5 a 10 minuten bij kamertemperatuur houden, dan onmiddellijk spectrofotometrisch meten

FYSIOLOGISCHE ASPECTEN VAN HET HYDROLASENPATROON

De levenscyclus van een typisch decapode Crustacee wordt beheerst door de vervelling: een vrij lange periode, waarin het dier zich voed en actief is, alterneert met een relatief korte periode, waarin het zijn oude exoskelet afwerpt en groeit.

Drach (1939) deelde de vervellingscyclus in 5 stadia in (A, B, C, D en E), steunend op morfologische criteria uit zijn onderzoek van *Cancer pagurus* en *Maia squinado*. Carlisle en Dohrn (1953) gaven een enigszins gewijzigde indeling en onderscheidden een 'premoult of proecdysis' stadium (D), 'ecdysis' (E), 'postmoult of metecdysis' (A en B) en 'intermoult, anecdysis of diecdysis' stadium (C). Vervellingsschema's aangepast aan de verschillende systematische groepen volgden o.a. van Drach (1944) en Scheer (1960) voor de Natantia, Kurup (1964) voor de Anomura en Stevenson (1968) voor de Macrura. De vervellingscyclus van de Reptantia, waaronder *Astacus*, is enigszins vergelijkbaar met het schema van Drach (1939) voor *Cancer pagurus*, gemodificeerd naar Passano (1960).*

De belangrijkste fysiologische karakteristieken, overeenkomend met de morfologische indelingscriteria, kunnen als volgt voorgesteld worden:

1. ophoping van reservemateriaal (in stadium C₄ en D₁);
2. vorming van het nieuwe exoskelet en resorptie van organische en anorganische bestanddelen uit de oude schaal (in stadium D₂ en D₃);
3. afwerpen van de oude schaal en opname van water (in stadium D₄, E en A₁);
4. opbouw van het nieuwe exoskelet uit de opgespaarde reserves en ionen uit het water (in stadium A₂, B₁ en B₂);
5. weefselgroei (in stadium C₁, C₂, en C₃).

Uit verscheidene fysiologische studies is de betekenis van deze vervellingscyclus voor de Crustacea gebleken. De hepatopancreas kan als centraal orgaan voor de stofwisseling gekwalificeerd worden (Urich 1961). De onderzoekingen van Renaud (1949) aan *Cancer pagurus*, Travis (1955) aan *Panu-*

* Zie bijlage 1.

lirus argus en O'Connor en Gilbert (1968) aan *Gecarcinus lateralis* en *Orconectes virilis* zijn representatief voor de variaties in het vetmetabolisme in relatie tot de vervellingscyclus en onderstrepen de belangrijke rol van de hepatopaneas als depot voor het reservemateriaal (voornamelijk in stadium C₄ en D₁). Renaud (1949) bij *Cancer pagurus*, Kurup en Scheer (1966) bij *Petrolisthes cinctipes* en Skinner (1965) bij *Gecarcinus lateralis* belichtten de rol van de hepatopaneas in het proteïne- en stikstofmetabolisme in het algemeen, evenals de 'vermoedelijke' rol in de synthese van enzymen nodig voor de resorptie van het oude exoskelet en de aanmaak van de nieuwe schaal. McWhinnie en Chua (1964), McWhinnie en Corkill (1964) en Puyear (1967) wezen op het belang van de oxydatieve reacties in de glycolyse bij *Orconectes virilis* gedurende het 'intermoult' stadium.

Naast het integument reflecteert ook het bloed de belangrijke metabolische veranderingen in correlatie met de vervellingscyclus, maar beide spelen in vergelijking met de hepatopaneas, een secundaire rol in de reservering van materiaal. Damboviceanu (1932) constateerde bij *Astacus* een stijging van de hoeveelheid serumproteïnen in het 'premoult' stadium, evenals Drilhon (1935) bij *Maia*, Travis (1955) bij *Panulirus argus* en Glynn (1968) bij *Homarus vulgaris*. *Maia* verbruikt hemocyanine in de hongerperiode gedurende het 'postecdysis'-stadium (Zuckermandl 1956). Bij *Carcinus maenas* (Busselen 1970) en *Crangon vulgaris* (Djangmah 1970) wordt de glycoproteïne fractie bij hongeren verbruikt.

Sinds de ontdekking van Abramowitz en Abramowitz (1940) dat oogsteel-ablatie resulteert in een stijging van de vervellingsfrequentie, is de regulatoire rol van het neuroendocriene systeem bij Crustacea intenser onderzocht. Neiland en Scheer (1953) toonden bij *Hemigrapsus nudus* aan dat sinusklievertirpatie bij hongerende individuen het stikstof- en vetgehalte van de hepatopaneas deed dalen. Kincaid en Scheer (1952) wezen op een stijging van bepaalde organische bestanddelen bij gevoede krabben volgend op sinusklierverwijdering. Fingerman et al. (1967) concludeerden uit oogsteel-ablatie-experimenten dat een neuroendocriene factor de synthese van RNA stimuleert en de proteïnesynthese bevordert. O'Connor en Gilbert (1967) wezen op een stijging van de vetsynthese bij *Orconectes virilis* na oogsteel-ablatie. Gorell en Gilbert (1969) vonden in vitro-experimenten een stimulerende werking uitgaande van crustecdysone op de eiwit- en RNA-synthese van de hepatopaneas bij dezelfde rivierkreeft. Thornborough (1968) stelde een duidelijke remming vast van de ribonuclease-activiteit in de hepatopaneas onder invloed van oogsteel-extracten bij *Palaemonetes vulgaris*.

De bovenvermelde gegevens zijn wel als voornaamste informatie te beschouwen inzake de belangrijke metabolische veranderingen in relatie tot de vervellingscyclus. Het is duidelijk dat externe en interne factoren de fysio-

logie van de Crustacea sterk beïnvloeden. Het doel van de in dit hoofdstuk beschreven experimenten is nadere inlichtingen te verzamelen omtrent de variaties in de voornaamste hydrolase-activiteiten in verschillende fysiologische toestanden. Zulks temeer daar tot op heden niet alleen weinig belangstelling bestond voor de enzymatische activiteiten betrokken bij de metabolische processen, maar ook omdat de meeste biochemische studies op dit terrein geen rekening hielden met de variaties optredend bij verschillende fysiologische toestanden.

In het eerste gedeelte werd de invloed van verschillende voedingstoestanden op de voornaamste hydrolase-activiteiten nagegaan in het kader van hun belangrijke rol bij de spijsvertering. In het tweede gedeelte is gezocht naar een mogelijke regulatie van de hydrolasen door de neurosecretorische centra van de oogsteel. In het derde gedeelte is de relatie onderzocht van de verschillende enzymactiviteiten met het seizoen enerzijds en met de vervellingscyclus anderzijds.

4.1. ONDERZOEK NAAR DE INVLOED VAN DE VOEDINGSTOESTAND OP DE HYDROLASE-ACTIVITEITEN IN DE HEPATOPANCREAS EN HEMOLYMFEN

4.1.1. Inleiding

De hepatopancreas is de hoofdbron van de enzymen met hydrolytische activiteiten. Door middel van histologische en enzymatische studies werden in de hepatopancreas van *Astacus*, *Orconectes*, *Thalamita* en *Atya* cyclische veranderingen aangetoond in aanmaak en secretie van enzymen na lange hongerperioden. Hirsch en Jacobs (1928, 1930) toonden in de hepatopancreas en het maagsap van *Astacus leptodactylus* na lange hongerperioden en op verschillende tijdsintervallen na voeding minima en maxima aan in enzymatische activiteit. Via histologische onderzoeken stelden zij in de kliertubuli ware 'golven' vast van de verschillende celtypen en trachtten de geconstateerde activiteitsveranderingen te correleren met de gevonden minima en maxima in aantal van de verschillende celtypen. Het maximale aantal B-cellen (voor de histologie zie 2.1.1.) stemde, volgens dezelfde auteurs, overeen met de maximale enzymactiviteit in de extracten van de hepatopancreas. Op basis van de gevonden resultaten stelden zij de hypothese op, dat er een cyclische restitutie, 'rijping' en secretie van enzymatisch actieve componenten aanwezig moest zijn. Vonk (1960) wees er terecht op dat dergelijke 'golven' moeilijk onder normale condities te veronderstellen waren, daar kreeften als continue voeders beschouwd moeten worden. Hij weet deze cyclische en ritmische activiteit van de klier dan ook aan de artificiële condities (lange

hongerperiode gevolgd door een korte voedingsperiode). Martin (1966) nam duidelijk omgrensde voedingsritmen waar bij *Marinogammarus*; hierbij dient echter vermeld te worden dat deze kreeftjes alleen voedsel opnemen bij vloed en zich dus duidelijk intermitterend voeden in relatie met de getijden. Ook bij insecten (Dadd 1970) werd bij de bestudering van de vertering onderscheid gemaakt tussen frequentie en occasionele voeders. Een scherp onderscheid tussen een automatische secretie van spijsverteringsenzymen bij frequente voeders en discontinue secretie bij insecten die slechts occasioneel voedsel opnemen, werd nooit aangetoond.

Na de onderzoeken o.a. van Zuckerkandl (1956) aan *Maia*, Busselen (1970) en Uglov (1969) aan *Carcinus maenas* en Djangmah (1970) aan *Crangon vulgaris* dient het bloed van Crustacea als een belangrijk depôt (voornamelijk voor eiwitten) beschouwd te worden. Zowel hemocyaninen (bij *Maia*) als glycoproteïnen (bij *Carcinus* en *Crangon*) schijnen volledig te verdwijnen bij hongerende dieren. Na zetmeeelektroforese associeerde Djangmah (1970) drie esterasefracties met een weinig intens optredende eiwitfractie. Cowden en Coleman (1962) echter vonden de esterase-activiteit duidelijk geassocieerd met de hemocyaninefracties bij *Panulirus argus*, *Gecarcinus lateralis* en *Grapsus grapsus*. Een variatie in het hydrolasenpatroon met betrekking tot de voedingstoestand is niet uitgesloten als men o.a. een 'clearing effect', zoals aangetoond bij vertebraten, zou verwachten (Engelberg 1964).

In de hiernavolgende experimenten werd nader ingegaan op: a. de invloed van vasten en voeden en b. de invloed van een korte voeding na een lange hongerperiode op het hydrolasenpatroon van de hepatopancreas en hemolymphe.

4.1.2. De invloed van hongeren en voeden

4.1.2.1. Materiaal en methoden

Als onderzoeksobject werden volwassen mannelijke kreeften geselecteerd naar lichaamsgewicht (tussen 70 en 100 g) en vervellingsstadium C ('intermoult') en in de proefopstelling ondergebracht, zoals beschreven in 1. onder 'proefobject'. Gedurende een acclimatisatieperiode van 4 dagen werden ze elke avond gevoerd met brokjes runderhart en -lever. De volgende morgen werd genoteerd of de dieren hiervan gegeten hadden. Na deze observatieperiode werden uitsluitend dieren, welke twee of meermalen gegeten hadden, als geschikt geacht voor het experiment. De ene helft van deze geselecteerde kreeften werd gedurende de volgende 21 dagen aan een hongertoestand onderworpen, terwijl de andere helft na 4 dagen en vervolgens om de 2 dagen

voedsel kreeg toegediend. Om een gestandaardiseerde maat te verkrijgen voor de hoeveelheid opgenomen voedsel per keer, werd overgegaan op een 'kunstmatige' manier van voeren. Hiertoe werd 0,6 tot 0,8 cc van een fijngemalen runderhart- en -levermengsel met behulp van een siliconencanule via de korte oesofagus in de maag gebracht.

A. Preparatie van het weefsel

Bij beëindiging van het experiment (21 dagen na de start en 12 uur na de laatste voeding in het geval van de gevoede kreeften) werd eerst het maagsap (1 à 2 cc) afgetapt en vervolgens de hemolymfe (5 à 10 cc). Na exsanguinatie werden de oogstelen geëxtirpeerd. Tenslotte werd de hepatopancreas uitgeprepareerd.

De linker oogsteel, het maagsap, de hemolymfe en het grootste deel van de hepatopancreas werden onmiddellijk in vloeibare stikstof diepgevroren en bewaard bij -20°C . Rechter oogsteel en enige stukjes hepatopancreasweefsel werden gefixeerd voor histochemisch onderzoek.

B. Elektroforetische en spectrofotometrische bepalingen

Na verzameling van het materiaal werden hepatopancreas en hemolymfe verder voorbereid voor het elektroforetisch en spectrofotometrisch onderzoek, zoals uiteengezet in 3.1.2. respectievelijk 3.3.2.. De oogstelen werden bewaard ter verwerking in een nader te beschrijven experiment (zie 4.2.3.).

De spectrofotometrische gegevens werden statistisch getoetst volgens de toets van Wilcoxon voor twee steekproeven en de t-toets van Student voor twee steekproeven.

4.1.2.2. Resultaten

Ter vergelijking van hongerende en gevoede dieren zijn in figuur 18 de zymogrammen weergegeven van de verschillende enzymactiviteiten in de hepatopancreas na disc-elektroforese en incubatie in de aangegeven substraten.

Proteasen en amylasen vertonen een analoog bandenpatroon in de twee voedingstoestanden, evenals de esterasen, alhoewel hierbij intensiteitsverschillen in de verschillende actieve enzymfracties onderling optreden. Het maximaal aantal esterasebanden bedraagt 10 in beide gevallen. De hydrolyse van α -naphthylacetaat is bij de hongerende kreeften intenser in de componenten nr.5 en 6, maar zwakker in de componenten 4 en 7. Voor de fosfasen is in de twee onderzochte pH-gebieden een verschil in aantal fracties waarneembaar: band 5 komt slechts bij gevoede dieren voor, terwijl in tegenstelling tot de esterasen de activiteit van de overige fracties onderling vergelijkbaar is.

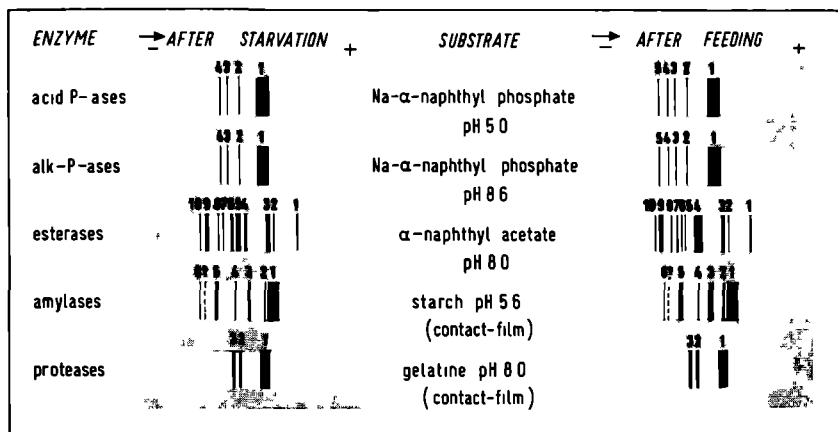


Fig.18. Hydrolase zymograms from the hepatopancreas of starved and fed crayfishes

Fig.18. Hydrolase-zymogrammen van de hepatopancreas bij hongerende en gevoede rivierkreeften

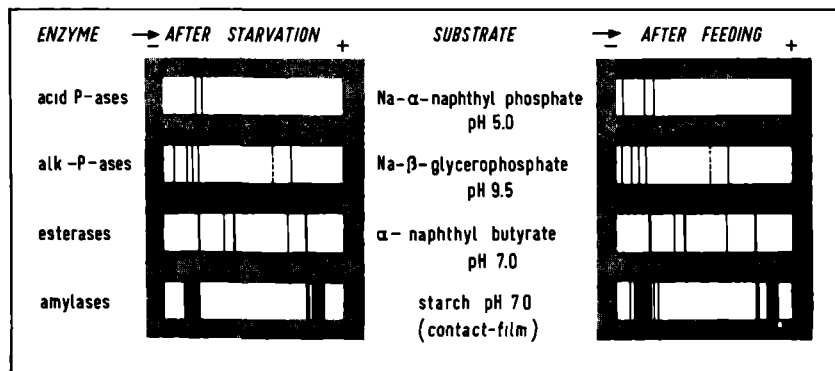


Fig.19. Hydrolase zymograms from the hemolymph of starved and fed crayfishes

Fig.19. Hydrolase-zymogrammen van de hemolymfe bij hongerende en gevoede rivierkreeften

In tabel 8 worden voor elk enzym de gemiddelde activiteitswaarden in de overeenkomstige activiteitseenheden van gevoede en hongerende dieren aangegeven, evenals de standaarddeviatie van de verschillende metingen, de grootste en kleinste gemeten activiteitswaarde, de tweezijdige overschrijdingskans en de toegekende toetsresultaten.

TABEL 8

Hydrolase-activiteiten in de hepatopancreas van gevoede en hongerende kreeften

Enzym	Voedings-toestand	n	\bar{x}	s	P_{t_2} (%)	Toets-resultaat	P_w (%)	Toets-resultaat	Activiteitswaarden	
									max	min
zure fosfatasen	1	13	17,66	6,35	92,0	n s	87,0	n s	26,47	9,84
	2	13	17,40	7,38					31,40	5,35
alkalische fosfatasen	1	13	7,74	3,70	90,0	n s	34,0	n s	25,78	0,30
	2	13	8,00	6,54					21,39	2,75
esterasen	1	11	1,17	0,40	90,0	n s	97,0	n s	1,84	0,62
	2	11	1,15	0,49					1,95	0,35
amylasen	1	6	90,50	27,92	64,0	n s	67,0	n s	132,50	53 00
	2	9	83,38	29,97					114,00	19 00
proteasen	1	11	6,94	1,81	62,0	n s	34,0	n s	9,62	2,81
	2	8	7,45	2,80					10,62	2,03

voedingstoestand 1 en 2 voedingstoestand van gevoede (1) en hongerende (2) kreeften

n aantal verwerkte kreeften

 \bar{x} rekenkundig gemiddelde van de bepaalde enzymactiviteiten in de activiteitseenheden, overeenkomstig 3 3

s standaarddeviatie van de metingen

 P_{t_2} (%) tweezijdige overschrijdingskans volgens de t-toets van Student voor twee steekproeven (in procenten) P_w (%) tweezijdige overschrijdingskans volgens de toets van Wilcoxon voor twee steekproeven (in procenten)

activiteitswaarden max /min grootste respectievelijk kleinste gemeten activiteitswaarden

Uit deze gegevens blijkt duidelijk dat enerzijds de onderzochte enzym-activiteiten in de hepatopancreas van gevoede en niet-gevoede dieren niet significant verschillen, maar dat anderzijds sterke individuele variaties in de enzymactiviteiten in beide groepen kunnen optreden

Zoals aangegeven in figuur 19 treden in de hemolymfe evenmin belangrijke verschillen op in het heterogeen patroon van de verschillende enzymatische actieve componenten. Het zymogram van de esterases en 'alkalische' fosfatasen is in beide voedingstoestanden identiek. Bij de hydrolyse van Na- α -naphthylfosfaat door de 'zure' fosfatasen blijkt echter een fractie (3) door hongeren te verdwijnen. Hongeren leidt soms ook bij de amylasen tot het verdwijnen van drie zwak reagerende banden (3, 4 en 6)

Een vergelijking van de enzymatische activiteiten in de hemolymfe bij hongerende en gevoede dieren toont eenzelfde tendens als de hydrolase-activiteiten in de hepatopancreas, zoals weergegeven in tabel 9.

TABEL 9

Hydrolase-activiteiten in de hemolymfe van gevoede en hongerende kreeften

Enzym	Voedings-toestand	n	\bar{x}	s	P_{t_2} (%)	Toets-resultaat	P_w (%)	Toets-resultaat	Activiteits waarden	
									max	min
zure fosfatasen	1	12	0,70	0,34	47,0	n s	24,0	n s	1,34	0,19
	2	11	0,60	0,31					1,47	0,41
alkalische fosfatasen	1	12	5,67	4,12	89,0	n s	71,0	n s	11,76	1,13
	2	11	5,97	6,42					22,58	1,13
esterasen	1	10	0,70	0,23	62,0	n s	62,0	n s	0,98	0,28
	2	8	0,81	0,65					2,34	0,35
amylasen	1	8	3,19	1,67	53,0	n.s	79,0	n s	6,41	1,70
	2	8	2,78	0,85					3,73	1,40

voedingstoestand 1 en 2 voedingstoestand van gevoede (1) en hongerende (2) kreeften

n aantal verwerkte kreeften

 \bar{x} rekenkundig gemiddelde van de bepaalde enzymactiviteiten in activiteitseenheden, overeenkomstig 3.3

s standaarddeviatie van de metingen

 P_{t_2} (%) tweezijdige overschrijdingskans volgens de t-toets van Student voor twee steekproeven (in procenten) P_w (%) tweezijdige overschrijdingskans volgens de toets van Wilcoxon voor twee steekproeven (in procenten)

activiteitswaarden max / min grootste respectievelijk kleinste gemeten activiteitswaarden

Onder invloed van de voedings- of hongerperiode treden geen significante verschillen op in de hydrolase-activiteiten. Individuele spreidingen binnen elke groep zijn aanzienlijk.

4.1.2.3 Discussie

Bauchau en Mengeot (1965) vonden in de hepatopancreas van *Carcinus maenas* een maximale amylase- en protease-activiteit in het vervellingsstadium C₁. Puyear (1969) constateerde bij *Callinectes sapidus* een vermeerdering van de pyrofosfatase-activiteit gedurende stadium C. Voornoemde auteurs schreven deze stijging toe aan het hervatten van de voedselopname, welke in het 'intermoult' stadium plaatsvindt.

Van Wormhoudt et al. (1972) bestudeerden de enzymatische activiteiten van de spijsverteringsenzymen (protease en amylase) in het vervellingsstadium C bij *Palaemon serratus*. Hun resultaten tonen aan dat de variaties in beide enzymactiviteiten parallel verlopen gedurende het 'intermoult' stadium en gecorreleerd zijn aan de voedselopname. Dit bevestigen zij door aan te

tonen dat in vervellingsstadium A, waarbij het dier in een 'natuurlijke' hongerperiode verkeert, de enzymatische activiteiten in de hepatopancreas zeer gering zijn. Daarentegen vonden zij dat bij een hongerperiode in stadium C de enzymactiviteiten weliswaar dalen, maar de minimale drempelwaarden niet bereikt worden en grote variaties aanwezig blijven. Wanneer het dier in een actief fysiologische toestand (stadium C) een hongerperiode ondergaat, zou afscheiding van spijsverteringsenzymen plaats kunnen vinden in een mate die weliswaar verschilt van de normale enzymactiviteit van een zich actief voedend dier, maar ongetwijfeld aanzienlijk hoger is dan bij een natuurlijk hongerend dier. Dit zou enigszins de mening van Vonk (1960) ondersteunen, dat secretieritmen onder natuurlijke omstandigheden nauwelijks optreden, daar Crustacea 'continu' voedselopnemende organismen zijn. Dergelijke situaties zouden volgens Dadd (1970) ook in het spijsverteringsmechanisme van insecten voorkomen.

Onze waarnemingen kunnen deze gevolgtrekkingen versterken: noch in de hepatopancreas, noch in de hemolymfe zijn tijdens een hongerperiode van 21 dagen in het 'intermoult' stadium enige significante kwantitatieve verschillen in de hydrolase-activiteiten meetbaar; bovendien komen zeer grote variaties voor. Fingerman (1967) beschreef zelfs een zwakke toename van de amylase-activiteit in de hepatopancreas van *Procambarus clarkii* na 10 dagen hongeren.

De volgende gegevens weerleggen de bewering dat een hongerperiode van 21 dagen onvoldoende zou zijn om van een hongerende kreeft te kunnen spreken. Speck en Urich (1969) vonden bij *Orconectes limosus* dat de energie gedurende de eerste 15 dagen van een hongerperiode vrijkomt door afbraak van overwegend lipiden en dat hierna, wanneer slechts structuurlipiden overblijven, zelfs proteïnen bij dit proces betrokken worden. Afbraak werd ook bevestigd door Busselen (1970) bij *Carcinus maenas*, waar een hongerperiode van 30 dagen (zowel in de lente als in de winter) het glycoproteïnegehalte in de hemolymfe doet dalen. Ook bij *Astacus leptodactylus* verdwijnt de glycoproteïne fractie in het bloed na 21 dagen hongeren (zie 3.1.2. (6)). Djangmah (1970) wees bij *Crangon vulgaris* niet alleen op het verdwijnen van de glycoproteïnen uit de hemolymfe na 23 dagen hongeren, maar ook op het dalend gehalte van de hemocyaninen na 37 dagen hongeren.

Het feit dat in onze experimenten het materiaal bij de gevoede kreeften pas 12 uur na de laatste voeding verzameld werd, zou mogelijk verantwoordelijk kunnen zijn voor de afwezigheid van een significant verschil in de enzymatische activiteiten ten opzichte van dieren die 21 dagen gehongerd hebben. Hirsch en Jacobs (1928, 1930) onderzochten het spijsverteringsritme in de hepatopancreas en het maagsap van *Astacus leptodactylus* tijdens een korte voedingsperiode, welke volgde op een lange hongerperiode. Uit

hun histofysiologische studie bleek dat een dergelijk ritme gedurende de eerste 6 uur na voedselopname aanwezig is en dat minima en maxima in deze periode aantoonbaar zijn. Speck en Urich (1970) toonden met behulp van met $U^{-14}C$ gemerkte voedingsstoffen aan, dat reeds na 15 minuten opname in alle delen van de darm plaatsvindt. Georgi (1969) wees op een snelle afloop van het verteringsproces in de rivierkreeft, daar reeds 2 à 4 uur na voedselopname onverteerde voedselresten als faeces worden afgegeven. Het is dus niet uitgesloten dat 12 uur na de laatste voeding de enzymatische activiteit tot een 'normaal' peil daalt. De directe invloed van voeding, welke op een lange hongerperiode volgt, wordt beschreven in 4.1.3.

Het identieke patroon van de verschillende onderzochte hydrolase-activiteiten in de hepatopaneas en hemolymfe bij de twee vergeleken voedings-toestanden bevestigt, afgezien van geringe variaties in activiteit van bepaalde fracties, het insignificante kwantitatieve verschil.

Travis (1955) wees in haar onderzoek aan *Panulirus argus* op het belang van de fosfatase-activiteit voor de opslag van calcosferieten in de R-cellen van de hepatopaneas (zie 2.1) bij kreeften in laat stadium C tot D. Pasteur (1959) toonde aan dat een hongerperiode een verlenging van het C-stadium veroorzaakt. Het is niet onwaarschijnlijk dat fractie 5 van de vijf fosfatase-actieve componenten in de hepatopaneasextracten, aantoonbaar na disc-elektroforese, een belangrijke rol zou spelen bij de defosforylatie tijdens de ophoping van calcosferieten.

Een verklaring voor het optreden van de drie supplementaire amylase-actieve banden (3, 4 en 6) in de hemolymfe van hongerende dieren alsook van een zure fosfatasefractie kon niet worden gegeven.

4.1.3. De invloed van een korte voedingsperiode na een lange hongerperiode op de hydrolasen van de hepatopaneas en hemolymfe

4.1.3.1 Materiaal en methoden

Om de invloed van een korte voedingsperiode, volgend op een lange hongerperiode, op het hydrolasenpatroon van de hepatopaneas en hemolymfe na te gaan, werd een analoge proef opgezet als beschreven in 4.1.2.1. Na selectie volgens de reeds eerder aangegeven criteria en een vierdaagse acclimatisatie bleven ongeveer 80 kreeften over om een hongerperiode van 3 weken te ondergaan. Na 21 dagen hongeren werden de dieren met een runderhart-lever-mengsel op de gebruikelijke wijze gevoed. Vanaf 30 minuten tot en met 6 uur na de voedseltoediening werden elk half uur monsters genomen van hemolymfe en hepatopaneas van telkens drie gevoede kreeften. Deze monsters werden onmiddellijk in vloeibare stikstof ingevroren. Om de in-

vloed van een eventueel dagritme uit te sluiten, werd bij elke monsterring eveneens materiaal verzameld van proefdieren die geen voedsel gekregen hadden Na verzamelen en opslaan van het ingevroren materiaal van alle kreeften in de verschillende voedingstoestanden, werden hepatopancreas en hemolymfe verder bewerkt als beschreven in 3 1 2 en 3 3 2

Evenals in het voorgaande experiment werden bij de elektroforetische analyse van de enzymatische activiteiten in de hepatopancreas de volgende gebufferde substraten gebruikt voor de fosfatasen Na- α -naphthylfosfaat (pH 5,0 en 8,6), voor de amylasen zetmeel (pH 5,6) en voor de proteasen gelatine (pH 8,0) Voor de esterasen werd in dit experiment als gebufferd substraat α -naphthylbutyraat (pH 8,0) gebruikt De hydrolase-activiteiten in de hemolymfe werden na elektroforese nagegaan met Na- α -naphthylfosfaat (pH 5,0) als substraat voor de zure fosfatasen, Na- β -glycerofosfaat (pH 9,5) voor de alkalische fosfatasen, α -naphthylbutyraat (pH 7,0) voor de esterasen en zetmeel (pH 7,0) voor de amylasen

Met betrekking tot de kwantitatieve enzymatische activiteitsbepalingen wordt verwezen naar de methoden beschreven in 3 3 2 Als statistische toetsen werden de Student's toets en de variantie-analyse met een criterium gebruikt

4 1 3 2 Resultaten

De mate van de veranderingen in de zymogrammen der onderzochte hydrolase-activiteiten in de hepatopancreas op verschillende tijdstippen na voeding wordt weergegeven in figuur 20

Gedurende de eerste 6 uur na voeding zijn de veranderingen in het aantal enzymatisch-actieve componenten per enzym gering Fluctuaties in bandbreedte van de afzonderlijke fracties zijn niet waarneembaar

Bij geen enkel proefdier treedt een verandering op in aantal en activiteit van de proteasebanden (fig 20E) voortdurend zijn drie actieve zones aantoonbaar In het esterazeynogram (fig 20A) van de meeste onderzochte kreeften zijn zes actieve fracties aanwezig, met uitzondering van de dieren welke 2½, 4½ en 5½ uur gevoed waren Bij die exemplaren ontbreken band 2 na 2½, 2 + 3 na 4½ en 3 na 5½ uur Markante veranderingen zijn evenmin vast te stellen in het fosfatasepatroon (fig 20B en C) In het zure pH-gebied (B) zijn in de hepatopancreas van vrijwel alle onderzochte dieren vier actieve componenten zichtbaar, met uitzondering van de meeste individuen uit de steekproeven van ½, 3, 3½, 5 en 6 uur na voeding, die fractie 2 missen Hierbij dient te worden opgemerkt dat band 4 in tegenstelling tot het voorgaande experiment (4 1 2) slechts bij een dier 2 uur na voeding geconstateerd is, terwijl bij twee van de drie kreeften ½ uur na voeding uitsluitend fractie 1 zichtbaar is In het alkalische pH-gebied (C) zijn slechts op vier

Fig.20. Variations in the pattern of the hydrolases in the hepatopancreas at different intervals after feeding

I. Diagram of the active fractions which can maximally be visualized after disc electrophoresis and incubation in the different media:

- | | | |
|---|--------------|---|
| A | esterases | α -naphthyl butyrate pH 8.0 |
| B | phosphatases | Na- α -naphthyl phosphate pH 5.0 |
| C | phosphatases | Na- α -naphthyl phosphate pH 8.9 |
| D | amylases | starch pH 5.6 |
| E | proteases | gelatin pH 8.0 |

II. Picture of the zymogram variations at different feeding periods ($\frac{1}{2}$ up to 6 h.)

For each feeding period, the zymogram of three crayfishes was studied. The presence of each fraction is given by () when the band is only present in one zymogram or by () of () when the components are twice or three times present. At each interval, the width of the different fractions was also expressed.

Fig.20. Variaties in het hydrolase-patroon van de hepatopancreas op verschillende tijdstippen na voedselopname

I. Diagram van de maximaal aantoonbare, actieve fracties na disc-elektroforese en incubatie in de verschillende media

- | | | |
|---|------------|--------------------------------------|
| A | esterasen | α -naphthylbutyraat pH 8,0 |
| B | fosfatasen | Na- α -naphthylfosfaat pH 5,0 |
| C | fosfatasen | Na- α -naphthylfosfaat pH 8,9 |
| D | amylasen | zetmeel pH 5,6 |
| E | proteasen | gelatine pH 8,0 |

II Schema van de zymogram-variaties voor de verschillende voedingsperiodes ($\frac{1}{2}$ tot en met 6 u.).

Voor elke voedingsperiode werden de zymogrammen van drie rivierkreeften bestudeerd. Indien een fractie slechts aanwezig is in één zymogram, wordt de aanwezigheid van deze fractie aangegeven met (); indien desbetreffende fractie twee- of driemaal voorkomt door () of (). Voor elk tijdstip werd ook de breedte van de band aangeduid.

monstertijdstippen (1, 1½, 2 en 4) vijf actieve componenten aantoonbaar. Bij de andere monsteringen zijn drie banden geregistreerd (nr.1, 3 en 5), terwijl de overige slechts sporadisch voorkomen. In het amylasezymogram (fig.20D) van vrijwel alle dieren zijn de drie het dichtst bij de anode gelegen banden altijd aanwezig. De meeste fluctuaties treden op bij de overige drie amylase-actieve componenten in de hepatopancreas. Alleen op de tijdstippen ½, 1, 3 en 6 uur na voeding is het maximaal aantal banden (6) aanwezig.

Na elektroforese van het hepatopancreasmateriaal van de hongerende dieren, dat zoals beschreven elk half uur werd verzameld, is bij geen der onderzochte hydrolasen een verandering in de heterogeniteit van de respectievelijke zymogrammen merkbaar.

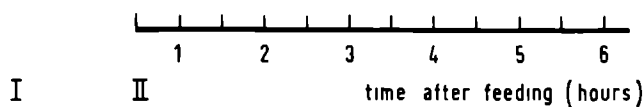
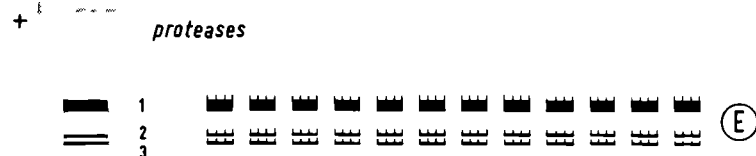
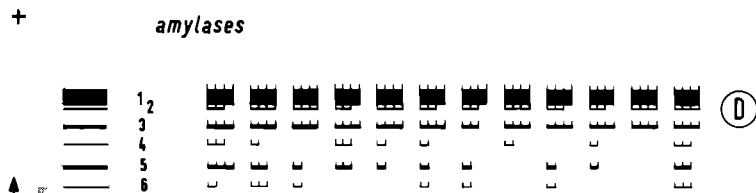
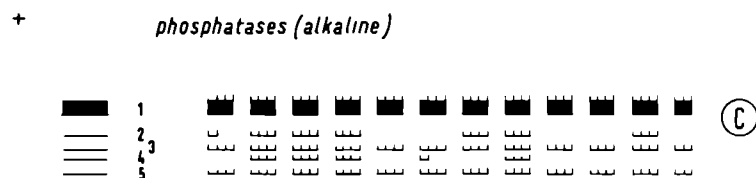
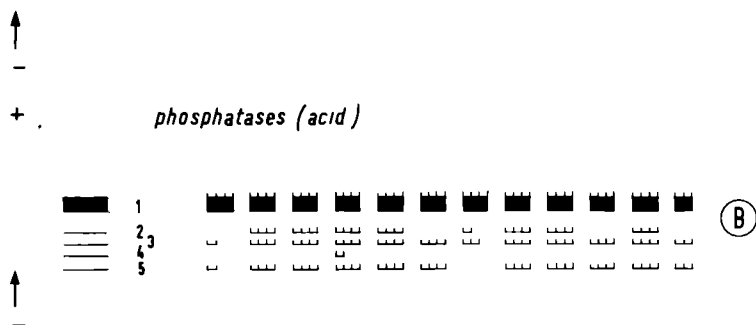
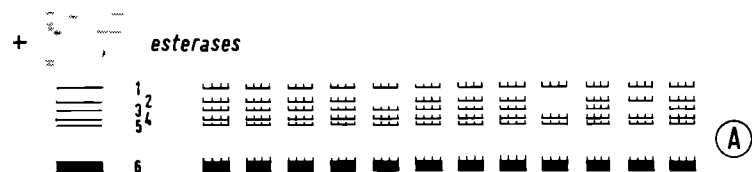


Fig.21. Variations in the pattern of the hydrolases in the hemolymph at different intervals after feeding

- I. Diagram of the active fractions which can be visualized after disc electrophoresis and incubation in the different substrate media:
- A: esterases : α -naphthyl butyrate pH 7.0
 - B: phosphatases : N- α -naphthyl phosphate pH 5.0
 - C: phosphatases : Na- β -glycerophosphate pH 9.6
 - D: amylases : starch pH 7.0
- II. Picture of the zymogram variations at different feeding periods ($\frac{1}{2}$ up to 6 h.). Explanation see legend of fig.20.

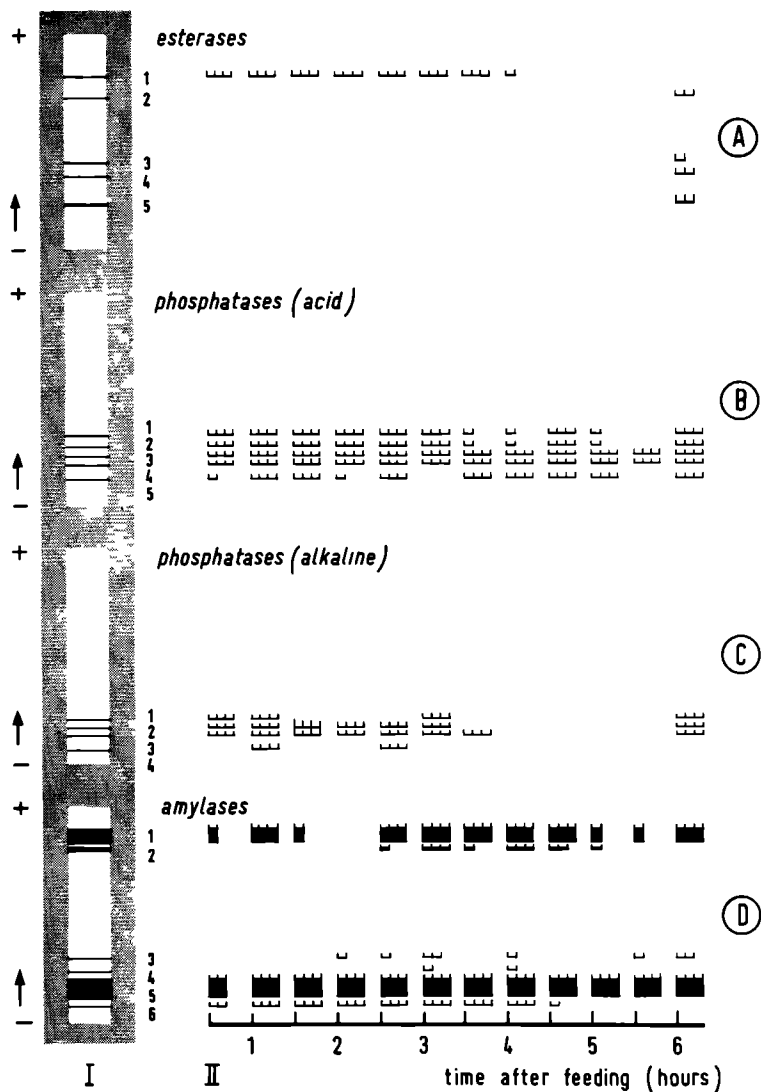
Fig.21. Variaties in het hydrolase-patroon van de hemolymfe op verschillende tijdstippen na voedselopname

- I. Diagram van de actieve fracties, aantoonbaar na disc-elektroforese en incubatie in de verschillende substraatmedia:
- A: esterasen : α -naphthylbutyraat pH 7,0
 - B: fosfatasen : Na- α -naphthylfosfaat pH 5,0
 - C: fosfatasen : Na- β -glycerofosfaat pH 9,6
 - D: amylasen : zetmeel pH 7,0
- II. Schema van de zymogram-variaties voor de verschillende voedingsperioden ($\frac{1}{2}$ tot en met 6 u.). Uitleg: zie legende bij fig.20.
-

Ook voor de hemolymfe zijn de veranderingen in de onderzochte enzymatronen afgebeeld in figuur 21.

In tegenstelling tot de esterasezymogrammen van de hepatopaneas, waarin nauwelijks veranderingen optreden, vinden in het esterasepatroon van de hemolymfe in de loop van enkele uren na voeding opvallende veranderingen plaats (fig.21A). 4 Uur na voedselopname treedt bij alle onderzochte proefdieren slechts één anodische esteraseband op; tussen 4 en 5½ uur is geen enkele fractie aantoonbaar en pas na 6 uur verschijnen bij twee van de drie geteste dieren vier nieuwe esterase-actieve componenten. Op dat moment vertoont het zymogram veel overeenkomst met het patroon van de dieren uit het vorige experiment (4.1.2.), ofschoon de snel migrerende fractie 1 ontbreekt.

Met betrekking tot de fosfatase-actieve componenten is het zymogram (fig.21C) bij een basische pH enigszins vergelijkbaar met het esterasepatroon, omdat ook hier een 'dode periode' optreedt tussen 4 en 5½ uur bij de drie onderzochte individuen. Op de andere monstertijden zijn minimaal één en maximaal vier componenten aantoonbaar. Behalve op de hierboven genoemde tijden zijn de fracties 2 en 3 voortdurend aanwezig, terwijl de banden 1 en 4 sporadisch zichtbaar zijn. Het aantal fosfatase-actieve fracties varieert echter zelden bij een zure pH (fig.21B). Alleen 3 uur en 5½ uur na



voeding wijkt het zymogram af van het maximale aantal van vijf actieve banden en wordt vier respectievelijk twee.

De amylasefracties 1 en 5 (fig.21D) zijn nagenoeg altijd aanwezig op de aangegeven tijden na voeding; de overige, minder actieve banden 2, 3, 4 en 6 komen naargelang de monsterring al dan niet voor. Bovendien treden in de

TABEL 10

Normentabel voor de amylase-actieve fracties na disc-elektroforese
(Acrylamideconcentratie 7%, pH 8,9, substraat zetmeel, pH 7,0, incubatie 10 uur bij 37°C)

Fractie	1	2	3	4	5	6
tijdstip						
½ uur	0-1-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	1-3-0	3-3-0
1 uur	2-2-1	0-0-0	0-0-0	0-0-0	4-4-4	4-4-4
1½ uur	3-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	4-3-2	3-3-3
2 uur	0-0-0	0-0-0	1-0-0	0-0-0	4-4-4	4-4-4
2½ uur	5-5-1	3-0-0	0-0-2	0-0-0	4-4-2	4-4-3
3 uur	4-2-3	2-0-2	1-0-1	1-0-0	4-4-2	4-4-3
3½ uur	3-3-3	2-0-0	0-0-0	0-0-0	3-2-2	3-3-3
4 uur	5-5-4	4-2-1	1-0-0	1-0-0	2-1-1	4-3-3
4½ uur	1-4-1	0-1-1	0-0-0	0-0-0	2-2-2	0-0-2
5 uur	1-0-0	1-0-0	0-0-0	0-0-0	2-1-1	0-0-0
5½ uur	1-0-0	0-0-0	1-0-0	0-0-0	1-1-1	0-0-0
6 uur	2-4-2	0-0-0	1-1-0	0-0-0	1-1-1	0-0-0

Verklaring van de waarderingsnorm

0 de desbetreffende fractie is afwezig,

1 tot 5 de fractie is aanwezig en vertoont een zodanige activiteit, dat een norm van 1, 2, 3, 4 of 5 kon worden toegekend (5 is de hoogste waarde!)

amylase-activiteiten binnen de groep van de anodische banden en binnen de groep van de kathodische banden vergelijkbare activiteitsveranderingen op. Met de contact-afdrukmethode konden kwantitatief geen activiteitsveranderingen in de afzonderlijke fracties gemeten worden. Door toekenning van een waarderingsnorm, variërend naargelang de breedte en de doorzichtigheid van de 'uitgevreten' zone van het gehydrolyseerde zetmeel, was het mogelijk de waargenomen activiteitsveranderingen voor elke fractie semi-kwantitatief uit te drukken. Volgens deze interpretatie waren bij de andere enzymen nauwelijks verschillen aantoonbaar. In tabel 10 zijn per monstertijdstip de toegekende waarderingsnormen weergegeven voor elke amylase-actieve band, bepaald bij drie kreeften. Figuur 22 geeft de grafische voorstelling van de steekproefgemiddelden, afgeleid van de drie individueel toegekende waarden per fractie.

Gedurende de eerste 3 uur van de periode na de lange hongertijd is de amylasewerking van fractie 5 en 6 zeer hoog, terwijl de overige componenten weinig of niet actief zijn. Tussen 2 en 3 uur treden echter ingrijpende ver-

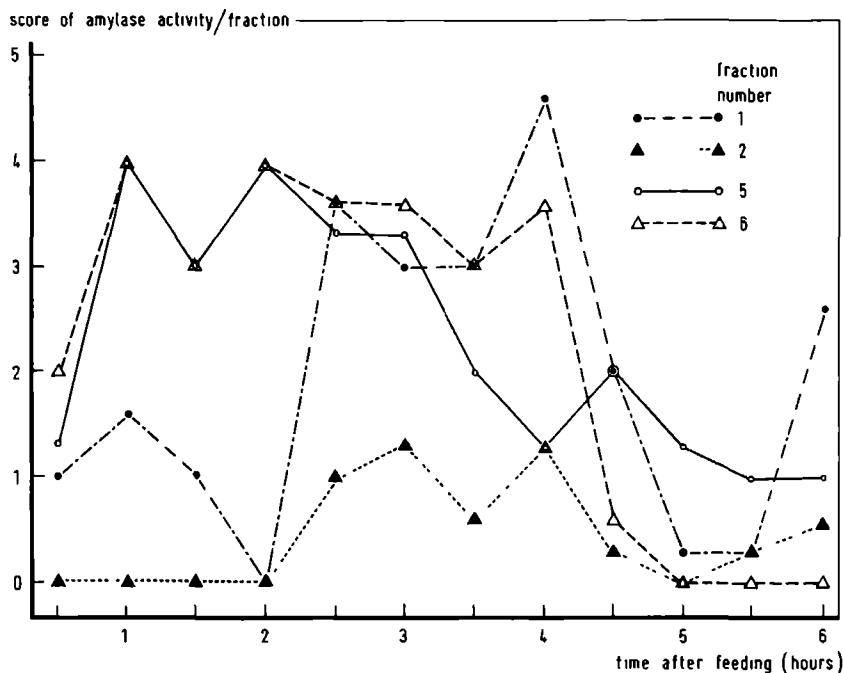


Fig 22 Variations in activity of the amylase fractions 1, 2, 5 and 6 in the hemolymph during a short period after feeding (explanation see text)

Fig 22 Variaties in de activiteit van de amylase-fracties 1, 2, 5 en 6 in de hemolymfe gedurende een korte periode na voedselopname (uitleg zie tekst)

anderingen in dit activiteitspatroon op Terwijl de traag migrerende banden 5 en 6 in activiteit dalen, neemt de activiteit van band 2 en in het bijzonder van band 1 snel toe; 4 uur na voeding worden ook zij minder actief. De banden 3 en 4 vertonen in de loop van deze proeffase ongeveer eenzelfde activiteitsverloop, ofschoon met een geringere hydrolytische werking. (Duidelijkheidshalve werden zij niet in de figuur opgenomen.)

Kwantitatieve veranderingen in de onderzochte hydrolase-activiteiten van hepatopancreas en hemolymfe op verschillende tijdstippen na voeding zijn met spectrofotometrische activiteitsbepalingen niet aangetoond. Vergelijking van de activiteitswaarden bij het gebruikte aantal kreeften (3 of 4 per tijdstip) levert volgens de variantie-analyse voor één criterium en de Student's t-toets geen significante verschillen op bij een waarschijnlijkheidsgrens van 5%

TABEL 11

Gemiddelde hydrolase-activiteiten in hepatopancreas en hemolymfe
tussen ½ en 6 uur na voeding

	Zure fosfatasen	Alkalische fosfatasen	Esterasen	Amylasen	Proteasen
hepato- pancreas	3,20(2) 10,14(1) 25,30(3)	0,70 3,12 6,20	1,00 1,99 7,00	200,00 129,71 81,00	1,10 4,82 7,22
hemolymfe	0,17 0,26 0,38	0,88 1,32 1,82	— 1,13 —	2,82 11,62 23,70	— — —

(1) Populatiegemiddelde van de bepaalde enzymactiviteiten in activiteitseenheden (overeenkomstig 3 3)

(2) Kleinste gemeten activiteitswaarde

(3) Grootste gemeten activiteitswaarde

TABEL 12

Verloop van de esterase-activiteit* in hepatopancreas en hemolymfe
gedurende de eerste 6 uur na voeding

1 Hepatopancreas

	Tijd ind	0	½	1	1½	2	2½	3	3½	4	4½	5	5½	6
oktober (herfst dieren)	1	2,2	1,6	1,9	3,0	1,5	1,3	2,0	2,4	2,1	1,2	2,1	2,3	2,0
	2	2,6	1,3	1,2	1,9	3,4	1,6	1,9	3,2	2,2	2,0	2,1	1,5	3,0
	3	2,5	1,8	2,2	2,8	2,4	0,7	2,1	2,9	2,1	—		1,0	1,4
	\bar{x}	2,4	1,6	1,8	2,5	2,4	1,2	2,1	2,8	2,1	1,6	2,1	1,6	2,1
maart (lentedieren)	1	3,7	2,4	5,3	3,2	2,6	4,3	2,9	2,7	3,5	2,9	14,1	4,3	6,7
	2	20,1	10,4	5,8	4,5	11,1	4,5	2,9	2,3	15,1	4,3	3,2	2,5	6,2
	3	8,8	2,1	2,1	4,2	9,1	7,3	20,8	16,9	4,4	4,6	2,3	11,6	11,5
	4	3,2	2,9	13,5	17,0	4,3	—	4,5	3,0	4,0	4,3	1,4	3,7	2,1
	\bar{x}	8,9	4,4	6,7	7,2	6,7	5,4	7,7	6,2	6,7	4,2	5,3	5,5	6,6

2 Hemolymfe

okt	\bar{x}	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,12
-----	-----------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------

* De enzymactiviteiten zijn uitgedrukt in activiteitswaarden, overeenkomstig 3 3

In tabel 11 is derhalve voor elk onderzocht enzym in de hepatopancreas en de hemolymfe uitsluitend het totale activiteitsgemiddelde van alle metingen van ½ tot en met 6 uur (≈ populatiegemiddelde) aangegeven alsmede de kleinste en grootste gemeten activiteitswaarde. Tabel 12 en de grafiek (fig.23) geven alleen het activiteitsverloop van de esterasen in de hepatopancreas en hemolymfe voor de verschillende tijdstippen (0 tot en met 6 uur). Vooruitlopend op 4.3.3., doch ter illustratie van de optredende fluctuaties zoals uit tabel 12 blijkt, werd in de grafiek ook de esterolytische activiteit uitgezet van dieren die in de lente aan analoge proefomstandigheden werden onderworpen.

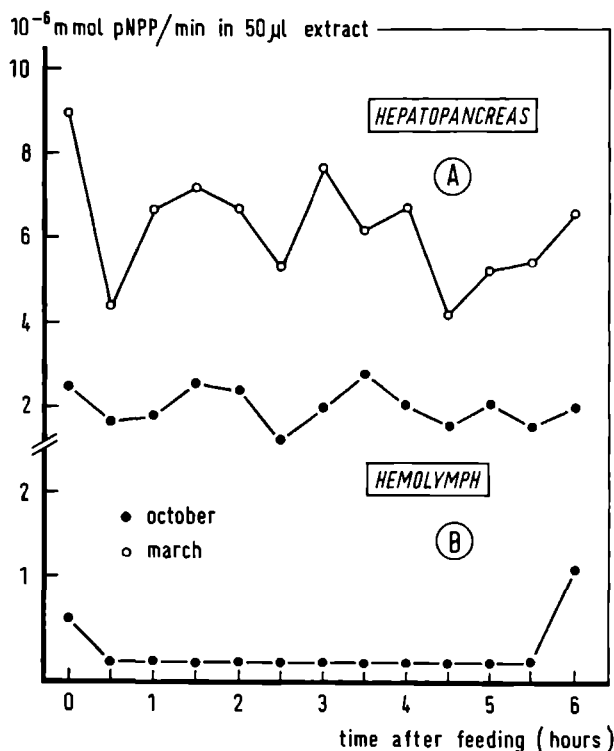


Fig.23. Variations in the esterase activity of hepatopancreas and hemolymph during the first hours after feeding

Fig.23. Variaties in de esterase-activiteit van hepatopancreas en hemolymfe gedurende de eerste uren na voedselopname

Ofschoon in de eerste helft van het experiment (tussen ½ en 3 uur) een

analoge tendens bestaat in het activiteitsverloop van de hepatopancreasesterasen bij lente- en herfst dieren, is een significante periodiciteit in het secretieritme gedurende een periode van 6 uur na voedselopname niet aanwezig. Daarentegen is de esterase-activiteit in de hepatopancreas van herfst dieren op de verschillende tijdstippen na voeding wel significant lager dan van lentedieren (betrokken op de waarschijnlijkheidsgrens van 5%). De esterase-activiteit bij lentedieren is gemiddeld 3 à 4 maal hoger dan bij herfst dieren. Bovendien treden bij lentedieren grotere verschillen op in de minimale en maximale activiteitswaarden evenals in de spreidingen per tijdstip.

De grafische voorstelling (fig.23B) van de esterase-activiteit in de hemolymfe stemt overeen met de resultaten van het zymogrampatroon in fig.21A: vanaf ½ uur tot en met 5½ uur na voeding is er geen meetbare esterase-activiteit aanwezig; eerst na 6 uur treedt hierin een duidelijke verhoging op.

4.1.3.3. Discussie

Zoals reeds eerder in dit hoofdstuk beschreven, treden geen significante veranderingen op in de hydrolase-activiteiten van hepatopancreas en hemolymfe bij hongerende en regelmatig gevoede dieren, waarvan het materiaal 12 uur na de laatste voeding is verzameld. Dat dit verschijnsel wellicht kon samenhangen met het bereiken van een 'normaal' peil in de enzymactiviteiten binnen 12 uur na voedselopname, werd daarbij niet uitgesloten.

Hirsch en Jacobs vonden in 1928 en 1930 bij *Astacus leptodactylus* een duidelijke periodiciteit in de amylase-, protease- en peroxidase-activiteit in de hepatopancreas en het maagsap. Dit verschijnsel brachten zij in correlatie met opvallende faseverschuivingen van de verschillende celtypes in de tubuli van de hepatopancreas wanneer zij rivierkreeften na een langdurige hongerperiode kortstondig voerden met vlees en gedurende 6 uur elk half uur monsterden. Daarnaast toonden zij ook een seizoengebonden verschil aan in de onderzochte enzymactiviteiten: in het voorjaar lagen de maxima hoger dan in zomer en herfst en waren ook grotere spreidingen waarneembaar.

In onze experimenten konden de resultaten van Hirsch en Jacobs wat betreft de enzymactiviteiten in de hepatopancreas na herhaalde pogingen niet gereproduceerd worden.

Bij de studie der zymogrammen van de onderzochte hydrolasen in de hepatopancreas zijn in het merendeel der patronen geen markante verschillen in aantal en activiteit van de componenten geconstateerd. Het optreden van de verschillende hydrolase-actieve componenten schijnt onafhankelijk van de voedingstoestand te geschieden.

Het ontbreken van significante kwantitatieve verschillen tussen de voedingstoestanden bij alle onderzochte hydrolasen in de hepatopancreas bevestigt de geringe variaties in het hydrolasenpatroon van de zymo-

grammen, doch is in tegenstelling met de conclusies van Hirsch en Jacobs. Nochtans zijn ook in onze experimenten significante seizoengebonden verschillen aantoonbaar in de hydrolase-activiteit van de hepatopancreas. De tegenstrijdige resultaten zouden als volgt kunnen worden verklaard:

- a. De enzymactiviteiten zijn aan sterke individuele factoren onderhevig en het aantal gebruikte proefdieren dient per tijdstip opgevoerd te worden. Hierbij dient echter vermeld te worden dat de resultaten van Hirsch en Jacobs (1928, 1930) eveneens op drie waarnemingen per monsterring berusten en dat ook in hun experimenten grote spreidingen optreden. Niet zonder reden vermeldde zij: 'Wir waren im Anfang der Untersuchung fast verzweifelt über die Grösse der Streuung' (p.125).
- b. De poging van Hirsch en Jacobs om het raadsel van de spreidingsgrootte toe te schrijven aan het hoger en sneller secretieritme bij lentedieren in tegenstelling tot dieren uit andere jaargetijden is ongemotiveerd. Het laatste deel van de volgende zinsnede uit hun publicatie krijgt dan ook een diepere betekenis: '..... Wir müssen hier dies Ergebnis (bedoeld is: seizoeninvloed) bereits vorwegnehmen, sonst erklärt jeder unbefangene Betrachter unserer Beobachtungspunkte uns für Phantasten.....' (p.126). Uit onze waarnemingen blijkt duidelijk dat zelfs in een proefreeks, uitgevoerd in de herfst (oktober), waarbij alle dieren op hetzelfde tijdstip en in dezelfde omstandigheden (o.a. selectiefactoren) werden bewerkt, kleinere spreidingen optreden, maar significante verschillen bij de verschillende voedingstoestanden uitblijven.
- c. Het optreden van een ritme in de enzymsecretie, zoals beschreven door Hirsch en Jacobs, hangt nauw samen met het 'actief' opnemen van het voedsel door de kreeft, in tegenstelling tot de door ons toegepaste wijze van voedseltoediening. In dit geval mag de invloed van o.a. chemoreceptoren in de omgeving van de monddelen en de innervatie van de korte oesofagus niet worden uitgesloten, ofschoon de reactie van de hepatopancreas op dergelijke prikkels zeer traag op gang komt.

In de literatuur is weinig bekend over de invloed van de voeding op de hydrolase-activiteit in de hemolymfe van Crustacea. Nochtans blijkt uit onze resultaten dat in de loop van de eerste 6 uur na voeding (volgend op een lange hongerperiode) duidelijke veranderingen optreden. De wijzigingen in het aantal esterase-actieve componenten, evenals de veranderingen in de totale esterase-activiteit in de hemolymfe vormen hiervan een voorbeeld.

Wyatt (1961) veronderstelde dat de meeste enzymen, aanwezig in de hemolymfe van insecten, afkomstig waren uit andere weefsels. Dit verschijnsel werd ook beschreven bij vertebraten. Laufer (1961) toonde bij *Cynthia*-poppen aan dat de middendarm verantwoordelijk is voor de aanwezigheid

van twee esterase-actieve fracties in het bloed. Bij extirpatie van de middendarm waren deze fracties niet aanwezig; na reïmpantatie werden ze opnieuw zichtbaar.

Het is niet uitgesloten dat een dergelijk verschijnsel ook bij Crustacea optreedt. Dit wordt evenwel nog door ons onderzocht. Het optreden van een verhoogde esterase-activiteit 6 uur na voeding en het verschijnen van vier nieuwe esterase-actieve banden op hetzelfde moment zou in een dergelijk mechanisme passen en verklaard kunnen worden als een zogenaamd 'clearing effect', dat ook bij vertebraten is aangetoond (Engelberg 1964).

Horn en Kerr (1969) toonden in het serum van de krab *Callinectes sapidus* amylase-activiteit aan in associatie met het zogenaamd 'complex protein', waarvan de juiste betekenis nog niet bekend is. Uit verschillende onderzoeken is echter wel gebleken dat dit eiwitcomplex kwantitatief een van de meest variabele in de hemolymfe is. De in dit onderzoek gevonden kwantitatieve veranderingen van de amylase-actieve componenten in de sera van *Astacus leptodactylus* met betrekking tot de voedingstoestand, zouden misschien aan een soortgelijk eiwit geweten kunnen worden. Uit elektroforetische analyses van de serumeiwitten blijkt immers het 'amidozwart' bandenpatroon te variëren en wel in dezelfde zones waar amylase-activiteiten aantoonbaar zijn. Een diepgaand en meer gericht onderzoek van dit probleem is gewenst.

4.2. ONDERZOEK NAAR DE INVLOED VAN DE NEUROENDOCRIENE CENTRA IN DE OOGSTEEL OP DE HYDROLASE-ACTIVITEIT IN HEPATOPANCREAS EN HEMOLYMFE

4.2.1. Inleiding

De mogelijkheid dat bij Crustacea enige neurosecretorische stoffen een regulerende werking uitoefenen op de enzymsecretie, voornamelijk van spijsverteringsenzymen, is nauwelijks onderzocht. Pas in de laatste jaren werd de aandacht gevestigd op de mogelijke rol van neuroendocriene substanties in de regulatie van de activiteit in de hepatopaneas.

Yamamoto (1953; 1960) vond dat de verwijdering van beide oogstelen bij de rivierkreeft *Procambarus clarkii* een degenererende invloed heeft op het hepatopaneasweefsel. Reeds 10 dagen na operatie treedt pycnose van de cellen op. Miyawaki en Tanoue (1962) toonden in een elektronenmicroscopische studie bij *Procambarus clarkii* aan, dat ook het endoplasmatisch reticulum in de degenererende hepatopaneas veranderingen ondergaat. Fingerman et al. (1967) onderzochten de invloed van oogsteelablatie en

oogstelextracten op verschillende metabolische processen en vonden o.a. variaties in de enzymatische activiteit van amylase en in het RNA-gehalte. Dieren waarvan de oogsteel verwijderd is, produceren weinig of geen amylase. Een neuroendocriene factor zou de synthese van RNA en proteïnen stimuleren. Thornborough (1968) stelde een duidelijke remming vast van de ribonuclease-activiteit in de hepatopaneas van *Palaemon vulgaris* na toediening van oogstelextracten van dezelfde soort.

Omtrent de regulatie van de enzymactiviteiten in de hemolymfe is tot op heden niets bekend.

In het volgend onderzoek werd:

- a. de invloed van de sinusklievertirpatie op het hydrolasenpatroon in de hepatopaneas en hemolymfe van hongerende en gevoede dieren nagegaan en
- b. het neurosecretorisch systeem in de oogsteel van hongerende en gevoede dieren histochemisch en elektroforetisch onderzocht.

4.2.2. De invloed van sinusklievertirpatie op het hydrolasenpatroon bij gevoede en hongerende kreeften

4.2.2.1. Materiaal en methoden

Teneinde de invloed van sinusklieverblatie op de hydrolase-activiteiten in hepatopaneas en hemolymfe bij gevoede en hongerende kreeften na te gaan, werden de dieren zonder sinusklievers niet alleen onderling, doch ook met niet geopereerde exemplaren vergeleken (4.1.2.). Hiertoe werd een analoog experiment, als beschreven in 4.1.2.1., gestart. Gedurende een acclimatisatieperiode van 4 dagen werden 52 kreeften geselecteerd naar geslacht (♂), gewicht (70 à 100 g) en vervellingsstadium (C) en in de reeds eerder beschreven opstelling ter observatie gehouden. Na deze periode, waarin de eetlust van de dieren werd gecontroleerd, werden bij alle dieren beide sinusklievers geëxtirpeerd. Hierna werden 26 kreeften gedurende 21 dagen aan een hongertoestand onderworpen, de overige 26 werden op de beschreven wijze elke 2 dagen gevoerd.

A. Sinusklieverblatie

In het beginstadium van het onderzoek naar de endocriene activiteiten van de sinusklievers was men aangewezen op een eenvoudige doch weinig nauwkeurige techniek, namelijk het verwijderen van de gehele oogsteel. Daar deze behalve de sinusklievers ook nog andere endocriene structuren bevat (o.a. het x-orgaan), werd naar een meer specifieke methode gezocht, namelijk het verwijderen van alleen de sinusklievers.

Tot de oudere technieken behoort die opgesteld door Brown et al. (1939) en toegepast op *Palaemonetes*. Deze techniek, die bestond uit het doorboren van de cuticula met behulp van een fijne naald en het opzuigen van de desbetreffende klier met een aspirator bij Crustacea met niet transparant chitinepantser, werd al spoedig herzien. In 1942 publiceerde Brown een verbeterde techniek, waarbij een gedeelte van de cornea lateraal werd weggesneden om aldus de sinusklier met een pincet te kunnen wegnemen. Ofschoon deze operatie slechts 5 minuten in beslag neemt, bleek beschadiging van de cornea een nadelige factor te zijn. Kincaid en Scheer pasten in 1952 een techniek toe, welke op de oorspronkelijke van Brown et al. (1939) geënt was. Hierbij werd het exoskelet van de oogsteel van *Hemigrapsus nudus* precies boven de sinusklier doorboord. De nu vrij liggende weefsels werden voorzichtig opzijgeschoven, waarna de sinusklier kon worden opgezogen. Bij deze methode werd de wonde noch afgesloten, noch gecauteriseerd.

Bij ons onderzoek aan *Astacus leptodactylus* pasten wij de methode van Kleinholtz (1947) toe, daar bij deze werkwijze weinig of geen letsel aan de oogganglia wordt toegebracht en eventuele infectie van de wonde wordt uitgesloten.

De proefdieren werden gedurende 1 à 3 minuten ondergedompeld in een chloroform : watermengsel (1 : 600). Om de oogsteel in een onbeweeglijke positie te houden, werd deze in een reepje aluminiumfolie vastgeklemd. Met behulp van een fijn tandartsboortje werd een schijfje uit de cuticula geboord ter hoogte van de sinusklier, de hypodermis en het epineurium opengesneden en de sinusklier, met de uitlopers, van de optische ganglia verwijderd. Na spoelen van de wonde met fysiologische zoutoplossing (Andrews 1967) werd het cuticulaschijfje met fibrin-foam opnieuw op de opening bevestigd.

Na extirpatie werd de kreeft 2 à 3 uur in quarantaine geplaatst, om vervolgens weer in de proefopstelling te worden opgenomen.

B. Preparatie van het weefsel

Bij beëindiging van het experiment (21 dagen na de start en 12 uur na de laatste voedseltoediening bij de groep der gevoede proefdieren) werd op de beschreven wijze gemonsterd (4.1.2.1.). Maagsap en hemolymfe werden afgetapt; na exsanguinatie werd de hepatopancreas uitgeprepareerd. Beide oogstelen werden afgesneden en gefixeerd in Bouin-Dubosq-Brazil (volgens 4.2.3.2.) ter controle van de ingreep.

C. Elektroforetische en spectrofotometrische bepalingen

Na verzamelen van het materiaal werden hepatopancreas en hemolymfe verder bewerkt voor elektroforese en kwantitatieve enzymactiviteitsbepalingen, als beschreven in 3.1.2. respectievelijk 3.3.2..

TABEL 13

Hydrolase-activiteiten in de hepatopancreas van gevoede en hongerende kreeften
na sinusklerektomie

Enzym	Voedings- toe- stand	n	\bar{x}	s	P_{t_2} (%)	Toets- resul- taat	P_w (%)	Toets- resul- taat	Activiteits waarden	
									max	min
zure fosfatasen	1	23	13,80	4,71	98,0	n s	99,0	n s	23,52	6,04
	2	24	13,76	5,57					22,95	3,97
alkalische fosfatasen	1	23	6,49	2,72	0,0	**	0,0	**	13,46	2,77
	2	24	4,17	2,69					13,59	0,37
esterasen	1	23	5,41	2,23	79,0	n s	94,0	n s	9,62	1,62
	2	24	5,58	2,43					12,00	1,80
amylasen	1	22	53,25	10,50	2,0	*	0,0	**	76,00	35,00
	2	23	43,95	16,08					87,00	21,00
proteasen	1	22	3,70	0,83	73,0	n s	20,0	n s	6,42	1,66
	2	22	3,81	1,29					5,14	0,64

voedingstoestand 1 en 2 voedingstoestand van gevoede (1) en hongerende (2) kreeften

n aantal verwerkte kreeften

\bar{x} rekenkundig gemiddelde van de bepaalde enzymactiviteiten in activiteitseenheden, overeenkomstig 3.3

s standaarddeviatie van de metingen

P_{t_2} (%) tweezijdige overschrijdingskans volgens de t-toets van Student voor twee steekproeven (in procenten)

P_w (%) tweezijdige overschrijdingskans volgens de toets van Wilcoxon voor twee steekproeven (in procenten)

activiteitswaarden max / min grootste respectievelijk kleinste gemeten activiteitswaarden

De spectrofotometrische gegevens werden tussen beide voedingstoestanden en in vergelijking met de proefdieren uit de proefopstelling, beschreven in 4.1.2 (= onbehandelde hongerende en onbehandelde gevoede kreeften) statistisch getoetst volgens de toets van Wilcoxon en de t-toets van Student voor twee steekproeven

4.2.2.2 Resultaten

De gegevens voor de hepatopancreas, verkregen uit de spectrofotometrische bepalingen, werden voor beide groepen kreeften vergeleken. In tabel 13 zijn voor elk enzym de gemiddelde activiteitswaarden, de standaarddeviatie en de hoogste en laagste waarde van de gemeten activiteiten weergegeven. Tevens worden de resultaten van de twee statistische toetsen vermeld, waarmee beide voedingstoestanden (= beide groepen) op hun significante verschil

TABEL 14

Vergelijking van de hydrolase-activiteiten in de hepatopancreas van:

I. gevoede niet geopereerde kreeften (1) en gevoede geopereerde kreeften (2)

II. hongerende niet geopereerde kreeften (1) en hongerende geopereerde kreeften (2)

Enzym	I/II	n	\bar{x}	s	P _{t₂} (%)	Toets- resultaat	P _w (%)	Toets- resultaat
zure fosfatasen	I 1	13	17,66	6,35	3,0	*	4,0	*
	2	23	13,80	4,71				
	II 1	13	17,40	7,38	9,0	(*)	16,0	n.s.
	2	24	13,76	5,57				
alkalische fosfatasen	I 1	13	7,74	3,70	24,0	n.s.	33,0	n.s.
	2	23	6,49	2,72				
	II 1	12	8,00	6,54	1,0	*	5,0	(*)
	2	24	4,17	2,69				
esterasen	I 1	11	1,17	0,40	0,0	**	0,0	**
	2	23	5,41	2,23				
	II 1	11	1,15	0,49	0,0	**	0,0	**
	2	24	5,58	2,42				
amylasen	I 1	6	90,50	27,92	0,0	**	0,0	**
	2	23	53,25	10,50				
	II 1	9	83,38	29,97	0,0	**	0,0	**
	2	23	43,95	16,08				
proteasen	I 1	11	6,94	1,81	0,0	**	0,0	**
	2	22	3,70	0,83				
	II 1	8	7,45	2,80	0,0	**	0,0	**
	2	22	3,81	1,29				

n : aantal verwerkte kreeften

 \bar{x} : rekenkundig gemiddelde van de bepaalde enzymactiviteiten in activiteitseenheden, overeenkomstig 3.3.

s : standaarddeviatie van de metingen

P_{t₂}(%) : tweezijdige overschrijdingskans volgens de t-toets van Student voor twee steekproeven (in procenten)P_w(%) : tweezijdige overschrijdingskans volgens de toets van Wilcoxon voor twee steekproeven (in procenten)

len werden getoetst. Uit deze gegevens blijkt dat er geen significante verschillen optreden in de 'zure' fosfatase-, esterase- en protease-activiteit in de hepatopancreas van gevoede en hongerende kreeften, waarvan tevoren de

sinusklieren werden geëxtirpeerd. Daarentegen treden na sinusklierablatie wel statistische verschillen op in de 'alkalische' fosfatase- en amylase-activiteit van de hepatopancreasextracten van beide groepen. Beide enzymen vertonen een hogere activiteit in de extracten van gevoede kreeften. Nochtans dient ook hier te worden gewezen op de grote individuele activiteitsverschillen binnen elke groep.

Door vergelijking van de enzymactiviteiten, gemeten in de hepatopancreasextracten van gevoede respectievelijk hongerende dieren uit deze proefreeksen, met die van gevoede respectievelijk hongerende dieren uit voorgaand experiment (4.1.2.) kon de invloed van de sinusklier worden nagegaan, daar deze als enige gewijzigde parameter bij beide proefreeksen optrad. De resultaten van deze vergelijking zijn aangegeven in tabel 14. Onder invloed van de sinuskliertextirpatie treden zeer significante verschillen op tussen de esterase-, amylase- en protease-activiteiten in de hepatopancreas van geopereerde en niet geopereerde gevoede respectievelijk hongerende dieren. Na verwijdering van de sinusklier stijgt binnen 21 dagen de esterase-activiteit in de hepatopancreas van zowel gevoede als hongerende dieren, terwijl de amylase- en protease-activiteiten bij beide voedingstoestanden dalen. De invloed van sinuskliertextirpatie op de 'zure' en 'alkalische' fosfatase-activiteiten is echter minder duidelijk en al dan niet significant. In beide pH-gebieden blijkt ook de voedingstoestand van invloed te zijn. Bij gevoede dieren neemt de 'zure' fosfatase-activiteit 21 dagen na de operatie belangrijk af; bij hongerende dieren vertoont echter de 'alkalische' fosfatase-activiteit een tendens tot daling.

Zoals aangegeven in figuur 24 A, B, C, D en E treden in de hepatopancreas ook verschillen in de zymogrampatronen op. Deze verschillen gelden niet alleen voor hongerende en gevoede dieren na sinuskliertextirpatie, maar evenzeer wanneer men deze beide groepen vergelijkt met niet geopereerde hongerende en gevoede dieren.

Wanneer men na disc-elektroforese en hydrolyse van het aangegeven substraat de esterase- en protease-actieve componenten bij geopereerde gevoede en hongerende dieren vergelijkt (fig. 24 A en D), dan treden slechts weinig veranderingen in de zymogrammen op. Bij hongerende dieren zijn tien actieve α -naphthylacetaatesterasen aanwezig, bij gevoede negen (vermoedelijk ontbreekt band 9). Intensiteitsverschillen tussen deze beide enzympatronen zijn nauwelijks aantoonbaar. In vergelijking met de esterazeymogrammen van niet geopereerde dieren (4.2.1.) is geen opmerkelijk verschil in het aantal actieve fracties waarneembaar. Daarentegen wordt meer α -naphthylacetaat afgebroken door esterase-actieve componenten in de hepatopancreas van niet geopereerde kreeften. Zoals uit figuur 24 D blijkt, zijn geen verschillen in het aantal eiwitsplitsende fracties aantoonbaar. Onafhankelijk van sinusklier-

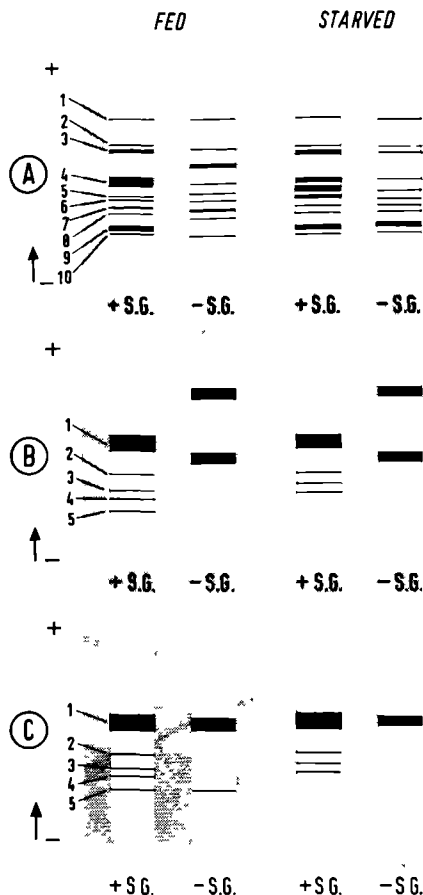


Fig. 24. Zymograms of the hepato-pancreas hydrolases from intact (+ S.G.) and sinus glandless (- S.G.) crayfishes after feeding and starvation

A: zymogram of the esterases (substrate: α -naphthyl acetate pH 8.0)

B zymogram of the 'acid' phosphatases (substrate: Na- α -naphthyl phosphate pH 5.0)

C: zymogram of the 'alkaline' phosphatases (substrate: Na- α -naphthyl phosphate pH 8.6)

D: zymogram of the proteases (substrate: gelatin pH 8.9)

E: zymogram of the amylases (substrate: starch pH 5.6)

extirpatie en voedingstoestand blijven drie actieve fracties aanwezig.

Wanneer men de 'zure' en 'alkalische' fosfatase-activiteiten vergelijkt na disc-elektroforese en splitsing van de aangegeven substraten, dan treden wel duidelijke verschillen op (fig. 24 B en C). Voor de 'zure' fosfatase-activiteit is het verschil tussen het zymogram van niet geopereerde en dat van geopereerde dieren, onafhankelijk van de voedingstoestand, duidelijk (fig. 24 B). Na sinusklieurextirpatie treedt zowel bij hongerende als gevoede dieren een nieuwe intense en snel migrerende fractie op, terwijl de meest kathodisch gelegen banden (2, 3, 4 en 5 voor de gevoede en 2, 3 en 4 voor de hongerende kreeften) verdwijnen. Een min of meer vergelijkbaar verschijnsel treedt op bij hydrolyse van Na- α -naphthylfosfaat in een alkalisch milieu: bij hongerende

Fig. 24. Zymogrammen van de hepatopancreashydrolasen bij intacte rivierkreeften (+ S.G.) en rivierkreeften zonder sinusklier (- S.G.) na voedselopname en hongeren

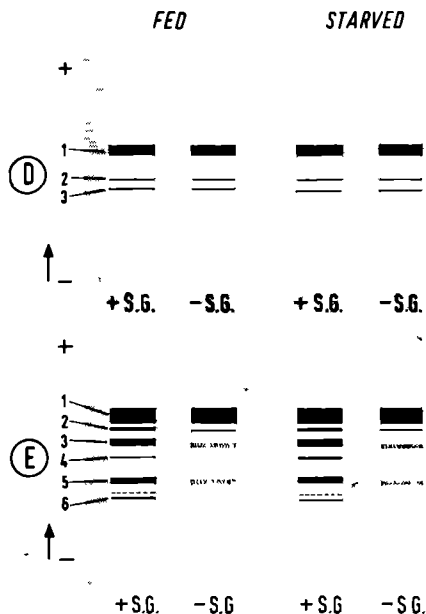
A: zymogram van de esterassen (substraat: α -naphthylacetaat pH 8,0)

B. zymogram van de 'zure' fosfatasen (substraat: Na- α -naphthylfosfaat pH 5,0)

C zymogram van de 'alkalische' fosfatasen (substraat: Na- α -naphthylfosfaat pH 8,6)

D zymogram van de proteasen (substraat: gelatine pH 8,9)

E: zymogram van de amylasen (substraat: zetmeel pH 5,6)



de en gevoede dieren verdwijnen na sinusklierextirpatie de drie kathodische fracties (2, 3 en 4), terwijl de 5e band bij gevoede kreeften zichtbaar blijft. Een nieuwe snel migrerende fractie is niet aanwezig.

Zoals aangegeven in figuur 24 E komen opvallende veranderingen voor bij vergelijking van de amylasezymogrammen van niet geopereerde en geopereerde kreeften, ongeacht de voedingstoestand. Bij niet geopereerde dieren zijn zes (soms zeven) positief reagerende componenten aantoonbaar; 21 dagen na sinusklierextirpatie treden echter in dit zymogram zowel bij gevoede als hongerende dieren veranderingen op: de banden 4 en 6 (+ 7) ontbreken, de componenten 2, 3 en 5 zijn aanwezig, maar hun hydrolase-activiteit is zwaker in tegenstelling tot fractie 1.

In tabel 15 worden de gemiddelde activiteiten in de hemolymfe, vergeleken tussen hongerende en gevoede geopereerde dieren, aangegeven tezamen met de betrokken standaarddeviatie en hoogste en laagste gemeten activiteitswaarde. Voor de twee toegepaste statistische toetsen zijn de P-waarden met hun toetsresultaten van beide groepen eveneens in de tabel opgenomen.

In tegenstelling tot de hepatopaneas zijn bij 'alkalische' fosfatase- en amylase-activiteiten geen significante verschillen bij de twee vergeleken voedingstoestanden aantoonbaar, evenmin als dat bij 'zure' fosfatase- en esterase-activiteiten het geval is. De tendens tot overeenstemming in het

TABEL 15

Hydrolase-activiteiten in de hemolymfe van gevoede en hongerende kreeften
na sinusklirextirpatie

Enzym	Voedings- toe- stand	n	\bar{x}	s	P_{t_2} (%)	Toets- resultaat	P_w (%)	Toets- resultaat	Activiteits- waarden	
									max	min
zure	1	22	0,29	0,13	10,0	n s	12,0	n s	0,69	0,09
fosfatasen	2	23	0,23	0,07					0,46	0,11
alkalische	1	21	2,43	2,64	98,0	n s	60,0	n s	12,84	0,53
fosfatasen	2	21	2,45	1,76					6,54	0,53
esterasen	1	23	0,73	0,15	14,0	n s	14,0	n s	1,06	0,45
	2	23	0,66	0,17					1,03	0,40
amylasen	1	21	1,46	0,78	36,0	n s	54,0	n s	3,05	0,39
	2	23	1,70	1,01					4,07	0,50

voedingstoestand 1 en 2 voedingstoestand van gevoede (1) en hongerende (2) kreeften

n aantal verwerkte kreeften

\bar{x} rekenkundig gemiddelde van de bepaalde enzymactiviteiten in activiteitseenheden, overeenkomstig 3.3

s standaarddeviatie van de metingen

P_{t_2} (%) tweezijdige overschrijdingskans volgens de t-toets van Student voor twee steekproeven (in procenten)

P_w (%) tweezijdige overschrijdingskans volgens de toets van Wilcoxon voor twee steekproeven (in procenten)

activiteitswaarden max / min grootste respectievelijk kleinste gemeten activiteitswaarden

patroon van de hydrolase-activiteiten in de hemolymfe van gevoede niet geopereerde en hongerende niet geopereerde dieren, zoals aangetoond in 4.1.2, blijft na sinusklirextirpatie bestaan. Een invloed van dit neurohemale orgaan gecorreleerd aan de voedingstoestand is, betrokken op het aantal aangegeven metingen, niet aanwezig.

De invloed van de sinusklir op de onderzochte hydrolasen treedt echter duidelijk naar voren bij vergelijking van de enzymactiviteiten tussen geopereerde gevoede en hongerende kreeften enerzijds en niet geopereerde gevoede en hongerende kreeften anderzijds. De desbetreffende numerieke gegevens worden vermeld in tabel 16. Onafhankelijk van de voedingstoestand treden zeer significante verschillen op in de 'zure' fosfatase-, 'alkalische' fosfatase- en amylase-activiteiten in de hemolymfe van beide groepen. Onder de beschreven proefomstandigheden daalt de activiteit van bovengenoemde hydrolasen 21 dagen na sinusklirextirpatie. De invloed hiervan op de esterase-

TABEL 16

Vergelijking van de hydrolase-activiteiten in de hemolymfe van:

I. gevoede niet geopereerde kreeften (1) en gevoede geopereerde kreeften (2)

II. hongerende niet geopereerde kreeften (1) en hongerende geopereerde kreeften (2)

Enzym	I/II	n	\bar{x}	s	P _{t₂} (%)	Toets- resul- taat	P _w (%)	Toets- resul- taat
zure fosfatasen	I 1	12	0,70	0,34	0,0	**	0,0	**
	2	22	0,29	0,13				
	II 1	11	0,60	0,31	0,0	**	0,0	**
	2	23	0,23	0,07				
alkalische fosfatasen	I 1	12	5,67	4,12	0,0	**	1,0	**
	2	21	2,43	2,46				
	II 1	11	5,97	6,42	1,0	*	5,0	(*)
	2	21	2,45	1,76				
esterasen	I 1	10	0,70	0,23	64,0	n.s.	84,0	n.s.
	2	23	0,73	0,15				
	II 1	8	0,81	0,65	31,0	n.s.	61,0	n.s.
	2	23	0,66	0,17				
amylasen	I 1	8	3,19	1,67	0,0	**	0,0	**
	2	21	1,46	0,78				
	II 1	8	2,78	0,85	0,0	**	1,0	*
	2	23	1,70	1,01				

Zie legenda tabel 14.

activiteit in de hemolymfe werd daarentegen niet waargenomen. Noch een honger- of voedingsperiode, noch sinusklierextirpatie laat een significante invloed op dit enzym in de hemolymfe zien. Evenals bij voorgaande gegevens blijken ook hier sterke individuele fluctuaties in de verschillende enzym-activiteiten binnen dezelfde groep merkbaar.

Veranderingen in het heterogeen patroon van de verschillende enzymatische activiteiten in de hemolymfe onder invloed van sinusklierextirpatie en in correlatie met hongeren of voeden, worden voor de onderzochte hydrolasen weergegeven in figuur 25 A, B, C en D.

Het bandenpatroon van de verschillende enzymatische activiteiten in de hemolymfe van gevoede en hongerende geopereerde kreeften vertoont een

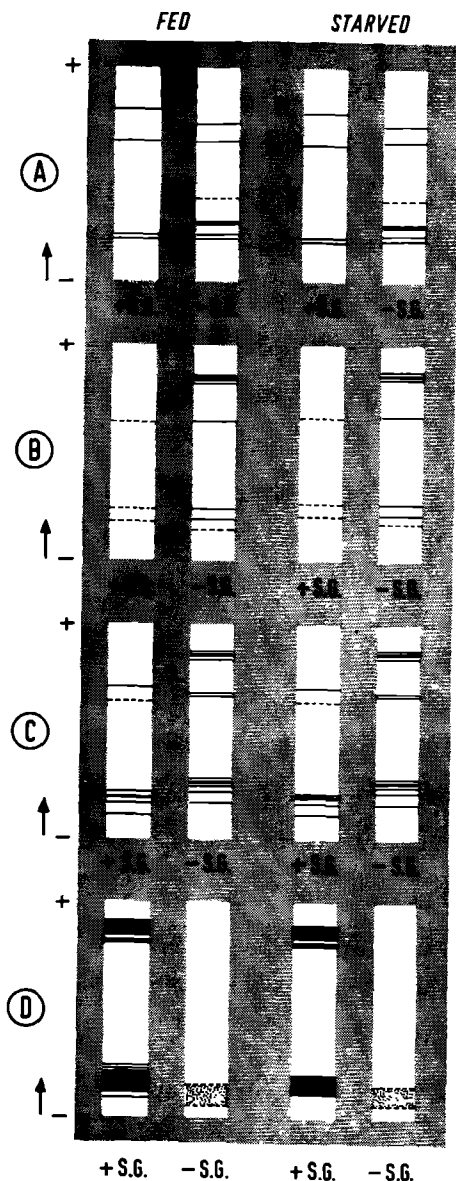


Fig.25. Zymograms of the hemolymph hydrolases from intact (+ S.G.) and sinus glandless (- S.G.) crayfishes after feeding and starvation

A: zymogram of the esterases (substrate: α -naphthyl propionate pH 7.0)

B: zymogram of the 'acid' phosphatases (substrate: Na- β -glycerophosphate pH 5.2)

C: zymogram of the 'alkaline' phosphatases (substrate: Na- β -glycerophosphate pH 9.5)

D: zymogram of the amylases (substrate: starch pH 7.0)

Fig.25. Zymogrammen van de hemolymfehydrolasen bij intacte rivierkreeften (+ S.G.) en rivierkreeften zonder sinusklier (- S.G.) na voedselopname en hongeren

A: zymogram van de esterassen (substraat: α -naphthylpropionaat pH 7,0)

B: zymogram van de 'zure' fosfatasen (substraat: Na- β -glycerofosfaat pH 5,2)

C: zymogram van de 'alkalische' fosfatasen (substraat: Na- β -glycerofosfaat pH 9,5)

D: zymogram van de amylasen (substraat: zetmeel pH 7,0)

identiek beeld. α -Naphthylpropionaat (A) is in beide voedingstoestanden hydrolyseerbaar door vijf, soms zes esterase-actieve banden; afhankelijk van de pH der substraatmedia kunnen zes, soms zeven Na- β -glycerofosfaatsplitsende

componenten worden aangetoond in het zure (B) respectievelijk tien in het alkalische pH-gebied (C). Met behulp van de contact-film-methode wordt na splitsing van zetmeel slechts één vage, traag migrerende amylase-actieve zone zichtbaar (D).

In tegenstelling tot de hydrolasezymogrammen van niet geopereerde gevoede respectievelijk hongerende dieren zijn hier wel veranderingen in het aantal enzymatische fracties voor de vier onderzochte hydrolasen waargenomen. 21 Dagen na sinusklieverwijdering verschijnen, onafhankelijk van de voedingstoestand, in het esterasespatroon (A) vijf in plaats van vier naphthylpropionaat-splitsende fracties: één uiterst actieve band wordt zichtbaar vóór de twee traagst migrerende fracties. Een vergelijkbaar verschijnsel komt ook voor in de zymogrammen van de fosfatase-actieve componenten. Zowel bij pH 5,2 (B) als pH 9,5 (C) worden na sinusklierablatie drie nieuwe Na- β -glycerofosfaat-splitsende en snel migrerende fracties zichtbaar, terwijl in het zure pH-gebied de drie zwakke banden uit het patroon van de niet geopereerde kreeften nu ook duidelijk waarneembaar zijn. In het alkalische pH-gebied is daarenboven een nieuwe kathodisch gelegen band aantoonbaar. Het aantal amylase-actieve componenten vermindert (D). Slechts één vage zone is zichtbaar aan de kathode; de twee snel migrerende fracties, aanwezig in de zymogrammen van niet geopereerde dieren, ontbreken.

Ofschoon in enige zymogrampatronen van hemolymfe en hepatopaneas de veranderingen minder opvallend zijn, kan een duidelijke invloed van de sinusklie extirpatie niet worden ontkend.

4.2.2.3. Discussie

Fingerman et al. (1967) toonden bij *Procambarus clarkii* de stimulerende invloed, afkomstig van een neurosecretorische substantie in de oogsteel, aan op de secretie van spijsverteringsenzymen door de hepatopaneas. Na oogsteelverwijdering constateerden zij zowel een daling van de amylase-activiteit in het maagsap als van de RNA-synthese in de hepatopaneas. Hieruit werd geconcludeerd dat van de oogsteel een stimulus op de RNA-synthese en dus ook op de proteïnen (enzymen) moet uitgaan. Van Wormhoudt blijkt volgens een recente mededeling (1972) een analoog resultaat bij *Palaemon serratus* en *Palaemon kerathurus* verkregen te hebben.

Onze waarnemingen wijzen in dezelfde richting. Belangrijke veranderingen in de hydrolase-activiteiten van de hepatopaneas kunnen 21 dagen na verwijdering van de sinusklie ook bij *Astacus leptodactylus* worden aangetoond. Nochtans mag de stimulerende invloed op één enkel enzym, zoals voorgesteld door Fingerman, niet generaliseerd worden. De protease- en amylase-activiteiten in de hepatopaneas nemen belangrijk af, zodat de sinusklie inderdaad een stimulerende of conserverende werking moet uit-

oefenen op de secretie van deze hydrolasen. Met betrekking tot de amylase-activiteit lijkt deze daling enigermate aan de voedingstoestand van de kreeft gebonden te zijn, daar zij bij hongerende dieren na sinusklierablatie aanzienlijk groter is.

Ook het aantal amylase-actieve fracties neemt bij sinusklierablatie duidelijk af, evenwel onafhankelijk van de voedingstoestand. Het verdwijnen van de banden 2, 4 en 6 en het vager worden van de banden 3 en 5 zijn des te opvallender, daar uit inhibitieproeven met koperionen (zie 3.1.3.) gebleken is dat genoemde fracties worden geremd. Een selectieve invloed van de sinusklie op de heterogeniteit van de amylase-actieve componenten is evident. Het is niet uitgesloten dat deze selectieve werking samenhangt met het kopermetabolisme. Djangmah en Grove (1970) toonden bij *Crangon vulgaris* aan dat gedurende een hongerperiode en het vervellingsstadium D₂/D₃ de hepatopaneas Cu uit het bloed opneemt en in zogenaamde 'copper vesicles' opslaat. Een hormonale regulatie werd niet nagegaan.

Daarentegen treden geen veranderingen op in de heterogeniteit van de protease-actieve componenten. Ongeacht de voedingstoestand en aanwezigheid van de sinusklie blijven drie actieve fracties aantoonbaar.

Voor de 'zure' fosfatase-activiteit zijn de gevolgen van sinusklieextirpatie minder duidelijk bij hongerende dieren (zie tabel 14). Wat betreft de 'alkalische' fosfatase-activiteit is een geringe afname alleen waarneembaar bij hongerende dieren. Overeenkomstige resultaten werden reeds eerder bij *Astacus leptodactylus* gevonden (Van Herp 1970). Hierbij traden 7, 14 en 21 dagen na sinusklieextirpatie geen significante veranderingen op in de 'alkalische' fosfatase-activiteit in de hepatopaneas van gevoede dieren. Voor de esterase-activiteit slaat de tendens van een dalende hydrolase-activiteit onder invloed van sinusklieverwijdering zelfs om in een significante stijging. Een definitieve verklaring voor deze uiteenlopende veranderingen van de onderzochte hydrolasen kon tot nu toe niet worden gegeven, wel ligt volgende suggestie voor de hand. Met behulp van histochemische methoden kon de hoogste esterase- en fosfatase-activiteit in de borstelzoom gelokaliseerd worden (2.1.). Hieruit mag worden geconcludeerd dat de microvilli naast een absorberende functie een bijzondere rol spelen bij de enzymatische splitsing van componenten uit de voedselbrei. Ugolev (1968) noemde deze terminale spijsverteringsprocessen, die in de omgeving van de plasmamembraan van de borstelzoom plaatsvinden, 'membraan- of contactvertering' in vergelijking met de 'luminale of cavitale vertering'. In tegenstelling tot de regulatie van de luminale verteringsprocessen is nauwelijks iets bekend over de regulatie van de membraanvertering. Een ander regulatiemechanisme in de controle van dit verteringstype is niet uitgesloten. Het is niet denkbeeldig dat het verschil in de onderzochte hydrolase-activiteiten in de hepatopaneas van *Astacus* hier-

mee samenhangt. Een stijging van de esterase-activiteit na sinusklierablatie zou dan betekenen dat een remmende invloed weggevallen is.

De heterogeniteit van de fosfatasen verandert na sinusklierexstirpatie. In het basisch en zure pH-gebied verdwijnen de banden 2, 3 en 4 onafhankelijk van de voedingstoestand; bij pH 5,2 verschijnt zelfs een nieuwe uiterst actieve fractie. Het optreden van deze componenten hangt vermoedelijk samen met de voorbereiding op de vervelling. Travis (1955) wees in haar onderzoek bij *Panulirus argus* op het belang van de fosfatase-activiteit in correlatie met de opslag van calcosferieten.

In de literatuur is niets bekend omtrent de relatie tussen de sinusklie of oogsteel en de enzymactiviteit in de hemolymfe. Uit onze resultaten blijkt deze relatie nochtans aanwezig, daar zowel in kwantitatief als kwalitatief opzicht verschillen optreden (zie tabel 16 en fig.25).

Uitgaande van de veronderstelling dat de hepatopaneas de voornaamste enzymbron is (Urich 1961) en dat de hydrolasen van de hemolymfe voornamelijk in de plasmafractie zijn gesitueerd (zie 2.2.3.), wordt het vermoeden bevestigd dat deze enzymen afkomstig zouden zijn uit de hepatopaneas (immunologische kruisingsexperimenten worden nog op het laboratorium uitgevoerd). Onze resultaten zouden deze veronderstelling kunnen versterken, daar de tendens tot kwantitatieve afname bij de onderzochte hydrolase-activiteiten zich ook in de hemolymfe manifesteert, met uitzondering van de esterases die in de hemolymfe onveranderd blijven. Ook het hydrolasenzymogram van hemolymfe en hepatopaneas vertoont overeenkomsten. Het aantal amylase-actieve componenten neemt na sinusklierablatie af, terwijl het aantal fracties in het esterase- en fosfatasepatroon stijgt. Een invloed van de sinusklie op de hydrolase-activiteit in de hemolymfe vindt waarschijnlijk indirect via de hepatopaneas plaats.

4.2.3. Histochemisch en elektroforetisch onderzoek van de oogsteelneurosecreten met betrekking tot hongeren en voeden

4.2.3.1. Inleiding

De microscopische anatomie van het protocefale endocriene systeem, waartoe het x-orgaan en de sinusklie behoren, vertoont bij de decapode Crustacea verschillen, die gedeeltelijk met de systematische rangschikking overeenstemmen. Verschillen in de lokalisatie hangen nauw samen met de morfologie van de cerebrale ganglia en voornamelijk met die van de optische ganglia. Volgens Hanström (1947) kan men vier typen onderscheiden:

Carcinus-type: deze Decapoda zijn voorzien van oogstelen en goed ontwikkelde ogen. De lamina ganglionaris, medulla externa, medulla interna en

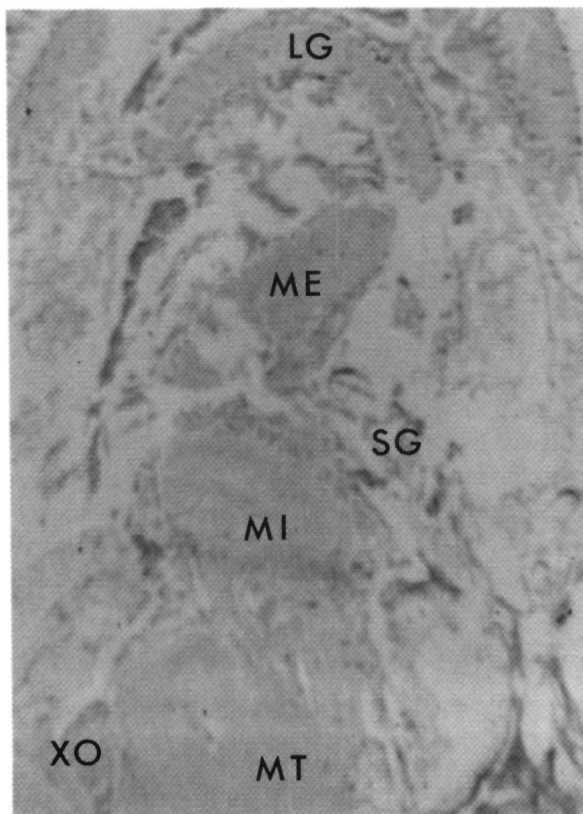


Fig.26. Microphotograph of a longitudinal section through the eyestalk showing the different ganglia, the x-organ and the sinus gland (after PFT staining)

Fig.26. Foto van een overlangse doorsnede door de oogsteel met aanduiding van de verschillende ganglia, het x-orgaan en de sinusklier (na PF-kleuring)

LG, lamina ganglionaris; ME, medulla externa; MI, medulla interna; MT, medulla terminalis; x, x-organ; SG, sinus gland

terminalis en de corpora pedunculata zijn alle in de oogsteel gelegen.

Emerita-type: bij deze Anomura is de medulla interna teruggetrokken in het protocerebrum. Het staat via een sterk verlengd chiasma internum in verbinding met de lamina ganglionaris en de medulla externa, die in de omgeving van het oog zijn gebleven.

Calocaris-type: deze Anomura onderscheiden zich van de voorgaande doordat het geheel van optische ganglia in het protocerebrum is teruggetrok-

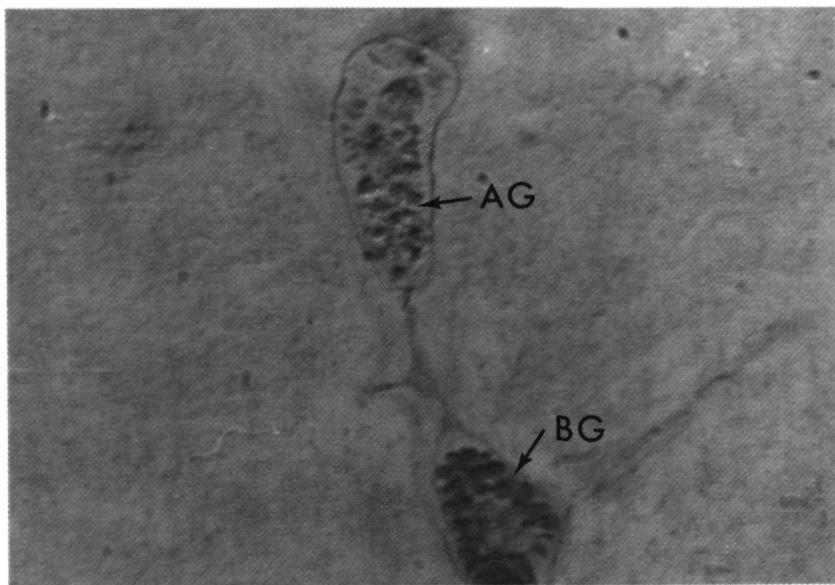


Fig.27. Microphotograph showing two neurosecretory cells in the medulla externa (after PRHB staining)

Fig.27. Foto van twee neurosecreethoudende cellen in de medulla externa (na PRHB-kleuring)

AG, acidophil granules stained by Ponceau red S; BG, basophil granules stained by anilin blue

ken. De oogsteel heeft als as alleen nog een optische zenuwuitloper.

Athanas-type: bij deze Natantia zijn de ogen door een secundaire versmelting van de optische ganglia in het protocerebrum 'zittend' of geheel zonder steel.

Astacus leptodactylus behoort zeer duidelijk tot het Carcinus-type: achter de halve bolvormige lamina ganglionaris ligt de dorsaal en ventraal enigszins afgeplatte medulla externa, gevolgd door de medulla interna en de grote medulla terminalis (fig.26).

Het *x-orgaan* is bij Reptantia en Brachyura gelegen op de medulla terminalis, zoals beschreven door Welsh (1941).

In tegenstelling tot Hanström (1947), die het *x-orgaan* niet aantrof bij *Astacus vulgaris*, is het *x-orgaan* bij *Astacus leptodactylus* wel aanwezig en rond de medulla terminalis gelegen, zoals ook door Welsh bij Reptantia werd

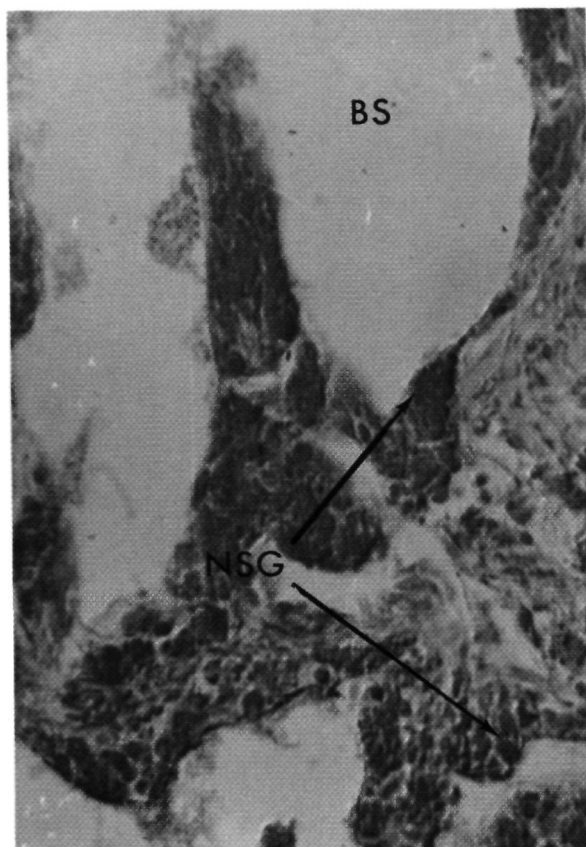


Fig.28. Microphotograph showing the sinus gland (after PFT staining)

Fig.28. Foto van de sinusklier (na PFT-kleuring)

NSG, neurosecretory granules in the axon terminals; BS, blood sinus

beschreven. Het bestaat uit een aantal opvallend grote cellen, die dichter tegen elkaar aan liggen dan de neurosecretorische cellen in de optische ganglia. Hun structuur is te vergelijken met celtype I van Durand (1956), die vier verschillende neurosecretorische celtypes onderscheidde in de oogsteel van *Orconectes virilis*. Hij lokaliseerde type I eveneens in het x-orgaan, tezamen met celtype II dat door ons in het gebied van het x-orgaan niet identificeerbaar was.

Behalve in het x-orgaan komen bij *Astacus leptodactylus* ook neurosecretorische cellen voor in de lamina ganglionaris en de drie medullae. In deze gebieden worden zowel acidofiele als basofiele neurosecreten geproduceerd (fig.27).

De sinusklier wordt bij decapoden naar vorm in verschillende typen ingedeeld (Hanström 1931, 1933; Sjörgen 1934). Het meest primitieve type bestaat uit een dikke schijf binnen het epineurium, een bindweefselachtig vliesje dat de ganglia omgeeft. Aan één kant staat deze schijf in contact met een volumineuze bloedsinus. Bij enige soorten wordt de bloedsinus door de perifere delen van de schijf omgeven. Door Hanström (1937) werd deze vorm het inverse type genoemd. Bij het everse type vormt het middengedeelte van de schijf een globulaire massa, die in zijn geheel door de bloedsinus wordt omgeven. De sinusklier van *Astacus leptodactylus* is vrij gemakkelijk te herkennen (fig.28): ze neemt een dorsolaterale positie in op de overgang van medulla externa naar medulla interna en behoort tot het inverse type. Doordat de klier uit talrijke lobuli bestaat, die elk een tak van de bloedsinus omgeven, geeft ze een zeer diffuse indruk, maar is niettemin een duidelijk voorbeeld van een neurohemaal orgaan, dat via de axonuitcinden de afgifte van neurosecretorisch materiaal aan het bloed verzorgt.

4.2.3.2. Materiaal en methoden

Bij de studie van de neurosecretie in de oogstelen met betrekking tot hongeren en voeden werden oogstelen gebruikt, die waren verzameld als beschreven in 4.1.2.1.. Voor het histochemisch onderzoek der neurosecreten werden rechter oogstelen aangewend, terwijl voor de elektroforetische analyse linker oogstelen werden gebruikt.

A. Histochemische methoden

1. Fixatie en kleuring

Om te achterhalen welke fixatievloeistof en histochemische kleurmethode het meest geschikt waren voor de studie der neurosecretorische cellen in de oogsteel van *Astacus leptodactylus* werden verschillende methoden uitgetest. Daar formol een goed gefixeerd object opleverde, werd een keuze gemaakt uit de volgende drie formolhoudende fixatieven: Bouin, Bouin-Dubosq-Brazil en Helly (zie Romeis 1948). De fixatie volgens Bouin-Dubosq-Brazil werd gekozen op grond van de goede snijdbaarheid van de chitineuze delen der oogstelen en zowel de neurosecretorische cellen met hun granula en axonen, als de sinusklier met tractus uit het x-orgaan en de verschillende medullae goed geconserveerd werden.

Na het gebruikelijke dehydreren in een alcoholreeks, ophelderen in

methylbenzoaat en insluiten in paraffine (58-60°C) werden 10 μ dikke overlangse seriecoupes gesneden. Na deparaffineren in xylol en hydreren via een alcoholreeks werden de volgende histochemische kleuringen uitgetest: paraldehyde-fuchsine met trichroom (PFT) of met picro-indigo-carmijn (PFPI) (Gomori 1950); hematoxyline-phloxine (HP) (Gomori 1941); Azur A triple kleuring (AAT) (Himes en Moriber, zie Gabc 1968) en Ponceau rood-Heidenhainblauw (PRHB) (Plantevin en Nardon 1970).

Zowel de sinusklier als de acidofiele en basofiele neurosecreten werden met PFT en PRHB gekleurd. Als gevolg van de positieve reactie van enige bloedcellen bij PRHB-kleuring werd aan PFT de voorkeur gegeven.

2. Kwantitatieve benadering van het aantal neurosecreethoudende cellen

Teneinde de invloed van een eventueel intern ritme op te vangen, werden seriecoupes gemaakt van oogstelen van drie hongerende en drie gevoede kreeften, waarvan het materiaal ongeveer op dezelfde tijd verzameld was. Het aantal acidofiele en basofiele neurosecreethoudende cellen werd per ganglion en in het x-orgaan geteld. Om doublures te vermijden werden in de even coupes alleen die cellen geteld, waarvan de kern duidelijk aanwezig was. Tevens werd nagegaan of de sinusklier zuur (basofiel) of basisch (acidofiel) reageerde en of de x-orgaan-sinusklier-tractus (XOSKT) gevuld waren met granula. Met deze telmethode werd een indruk verkregen van het aantal neurosecreethoudende cellen per ganglion.

Het percentage zure respectievelijk basische neurosecreethoudende cellen per ganglion werd ten opzichte van het totale aantal neurosecreethoudende cellen per oogsteel berekend. Op die wijze werd de vergelijking van de aantallen in de afzonderlijke ganglia voor oogstelen onder verschillende omstandigheden mogelijk. Met de t-toets van Student voor twee steekproeven werden mogelijke verschillen nagegaan.

B. Elektroforetische methode

Aangezien het percentage neurosecreethoudende cellen, verkregen na telling, op zichzelf geen indruk geeft van de hoeveelheid neurosecreet per oogsteel, werd het neurosecretorisch materiaal disc-elektroforetisch onderzocht om aldus mogelijke kwantitatieve en/of kwalitatieve veranderingen na te gaan.

Van de diepgevroren linker oogstelen werden in fysiologische oplossing (4°C) exoskelet, facetoog en spiermassa weggeprepareerd. Het resterende gedeelte, hoofdzakelijk uit ganglia bestaande, werd bij 4°C gehomogeniseerd in een 40% sucrose-oplossing en op het polyacrylamide gel gebracht. Uit steekproeven naar het eiwitgehalte volgens de methode van Lowry bleek dat de gemiddelde hoeveelheid eiwit per oogsteel ongeveer 0,68 mg bedroeg,

hetgeen vergelijkbaar is met het gehalte van circa 0,8 mg, aangetoond door Keller (1969) bij *Orconectes limosus*.

Na uittesten van de verschillende gelsystemen (Maurer 1968) werd de beste scheiding verkregen met het systeem, waarvan het 'separation gel' een acrylamideconcentratie had van 15% bij pH 8,9. De gemiddelde elektroforeseduur bedroeg 45 minuten.

De neurosecreten werden zichtbaar gemaakt met een paraldehyde-fuch-sinekleuring, welke door Kvistberg et al. (1966) voor het kleuren van insuline in polyacrylamide gels werd gebruikt en door ons aangepast voor het kleuren van neurosecreten bij *Astacus leptodactylus* (Van Herp et al. 1972).

Voor algemene eiwitkleuringen werden de volgende methoden gebruikt: amidozwart 10 B; glycoproteïne-kleuring volgens Maurer (1968); lipoproteïne-kleuring volgens Ressler et al. (1961).

TABEL 17

Percentage neurosecrethoudende cellen in de oogsteel bij gevoede en hongerende dieren

Oogsteel van		Lamina ganglionaris		Medulla externa		Medulla interna		Medulla terminalis		X-orgaan		Sinus-klier	XOSKT
gevoede	T	Z	B	Z	B	Z	B	Z	B	Z	B		
	661	5,1	23,6	12,0	13,0	4,8	8,0	5,5	3,8	9,8	14,4	Z!	—
	741	9,9	29,4	11,7	18,5	3,5	5,3	3,5	5,4	5,1	7,7	Z!	—
	901	9,2	32,7	9,9	9,9	2,2	5,7	3,2	9,5	4,0	9,9	Z!	—
	\bar{x} 767	8,1	28,6	11,2	15,1	3,5	6,3	4,1	6,2	6,3	10,7		
hongerende	737	11,9	22,4	11,3	19,6	4,6	8,4	4,2	7,1	4,1	6,4	Z!	±
	927	13,4	17,6	19,4	17,2	6,0	8,0	6,0	6,5	7,6	7,3	Z!	—
	882	11,8	17,6	6,7	18,4	1,8	6,4	9,2	12,0	8,3	7,8	Z-B!	+
	\bar{x} 848	12,4	19,2	9,5	18,4	4,1	7,6	6,5	8,5	6,7	7,2		

T : totaal aantal neurosecrethoudende cellen per oogsteel

Z : % neurosecretorische cellen met zure (basofiele) neurosecretgranula, per ganglion

B : % neurosecretorische cellen met basische (acidofiele) neurosecretgranula, per ganglion

Z! /Z-B! : zuur of zuur tot basisch neurosecret in de sinusklier

+ /± /— : XOSKT (x-orgaan-sinusklier-tractus) bevatten respectievelijk veel, weinig, geen neurosecretgranula

4.2.3.3. Resultaten

In tabel 17 is het totale aantal neurosecrethoudende cellen per oogsteel aangegeven, evenals het percentage zure en basische neurosecrethoudende

cellen, verdeeld over de vier ganglia en het x-orgaan. Tevens zijn de aard van kleurbaarheid der neurosecreetgranula in de sinusklier en een schatting van de aanwezige hoeveelheid neurosecreet in de XOSKT opgenomen.

Uit de grafische voorstelling (fig.29), gecombineerd met de statistische verwerking volgens Student's t-toets, blijkt dat het aantal acidofiele en basofiele neurosecreethoudende cellen in de drie medullae en het x-orgaan bij gevoede en hongerende dieren niet belangrijk uiteenloopt. Het percentage cellen met acidofiele granula, aanwezig in de lamina ganglionaris, is echter wel significant te noemen ($P = 2-5\%$). Bij gevoede kreeften zijn er meer acidofiel reagerende neurosecretorische cellen aanwezig.

Opvallend is het overwicht van acidofiele neurosecretorische cellen in de lamina ganglionaris en de drie medullae, terwijl de sinusklier als reservoir (neurohemaal orgaan) van het neurosecreet basofiel reageert. Een verschil tussen gevoede en hongerende kreeften is in dit opzicht niet aanwezig; een tendens tot ophoping van neurosecreetgranula in de XOSKT bij hongerende dieren is daarentegen wel merkbaar (fig.30).

Na disc-elektroforese in een 15% gel bij pH 8,9 en kleuring met paraldehyde-fuchsine zijn zes positieve anodische componenten aantoonbaar, waarvan de snelst migrerende band door geen enkele algemene of speciale eiwitkleuring geïdentificeerd kon worden. Na amidozwart-kleuring waren 16 anodische fracties zichtbaar; slechts één fractie was lipoproteïne-positief, geen enkele component reageerde glycoproteïne-positief (fig.31).

Het aantal componenten bij oogsteelextracten van gevoede en hongerende dieren is na PF-kleuring vrijwel gelijk. Een grote variatie treedt op in mobiliteit, dikte en intensiteit van de banden, zelfs bij individuen van eenzelfde voedingstoestand. Na 'pooling' van de monsters binnen elke groep werd de variatie opgevangen en kwamen geen kwantitatieve en slechts minieme kwalitatieve verschillen tussen beide voedingstoestanden voor.

4.2.3.4. Discussie

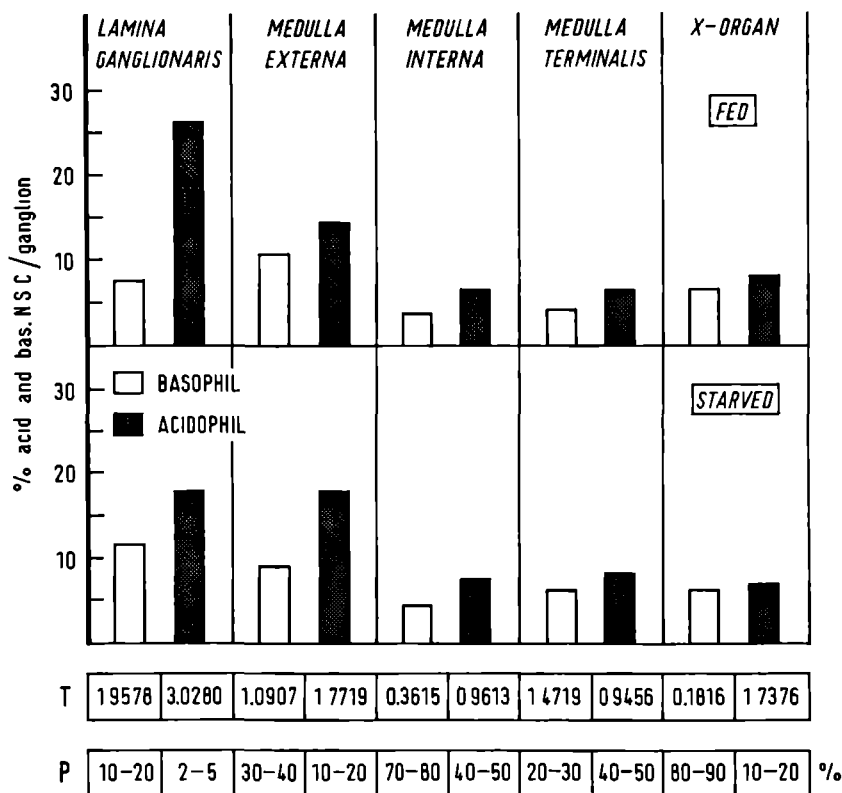
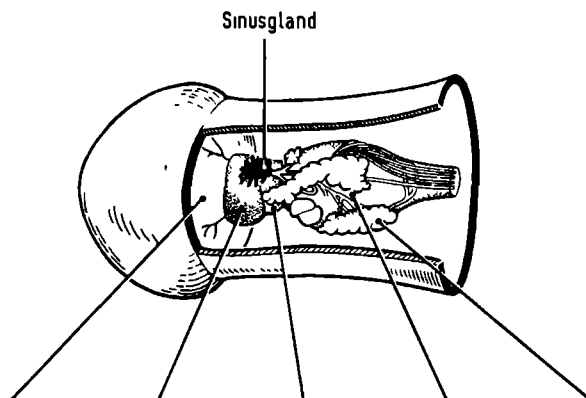
In de oogsteel van *Astacus leptodactylus* zijn acidofiel en basofiel reagerende neurosecretorische cellen aanwezig, verspreid over het x-orgaan en de vier ganglia: lamina ganglionaris, medulla interna, externa en terminalis. De sinusklier reageert daarentegen alleen basofiel. De indruk bestaat dat de kleureigenschappen van het neurosecreet tijdens het transport via de verschillende tractus veranderen. Dit verschijnsel wordt zowel bij gevoede als honge-

Fig.29. Comparison of the percentages of neurosecretory cells in the eyestalk of fed and starved crayfishes.

Fig.29. Vergelijking van de percentages der neurosecreethoudende cellen in oogstelen van gevoede en hongerende rivierkreeften

EYESTALK OF *CAMBARUS VIRILIS*

(after BLISS, DURAND and WELSH, 1954)



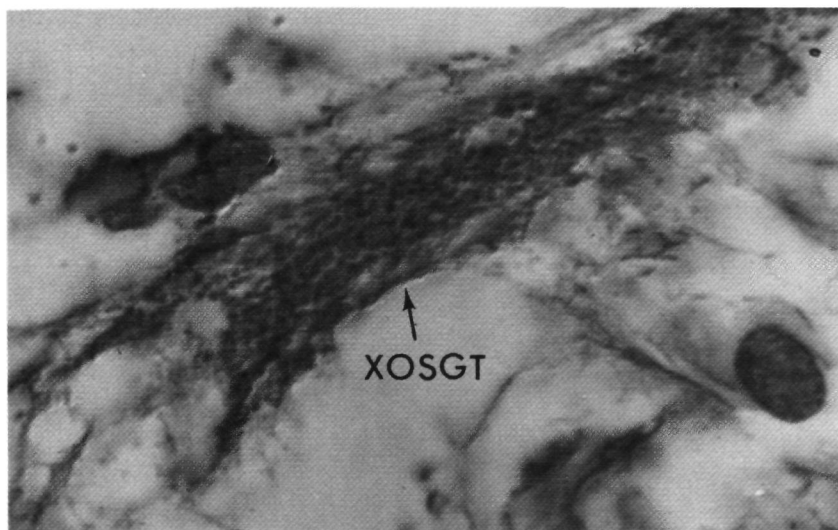


Fig.30. Microphotograph of a longitudinal section through an x-organ-sinus gland-tract (XOSGT) showing an axon filled with basophil neurosecretory granules (after PFT staining)

Fig.30. Foto van een overlangse doorsnede door een x-orgaan-sinusklier-tractus (XOSGT) waarvan de axonen gevuld zijn met basofiele neurosecretorische granula (na PFT-kleuring)

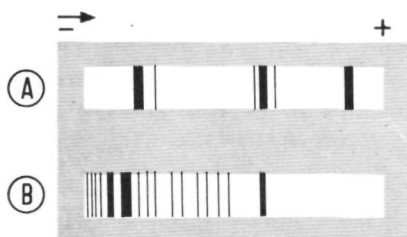


Fig.31. Electrophoretic pattern of the eyestalk extract after PF staining (A) and amido-black staining (B) (acrylamide concentration 15% pH 8.9)

Fig.31. Elektroforetisch patroon van de oogstelextracten na PF kleuring (A) en amido-zwart-kleuring (B) (acrylamideconcentratie 15% pH 8,9)

rende dieren waargenomen. Het is niet bekend of het gepaard gaat met chemische structuurveranderingen van het neurosecret.

Het PF-materiaal wordt bij *Chirocephalus diaphanus* gekenmerkt door een grote hoeveelheid S-S-bridgen (Lake 1970); de gevonden kleurverschillen

zouden volgens deze auteur kunnen berusten op een verschil in het aantal cystinemoleculen van de hormonen. De binding van neurohormonen aan eventuele dragereiwitten kan daarentegen ook een verklaring zijn voor de kleuromslag (Schreiner 1966). Fysische factoren (densiteit van de structuren, diffusiecoëfficiënten van de kleurstoffen) kunnen echter ook de oorzaak zijn (Gabe 1967). Nochtans werden vergelijkbare resultaten gevonden door Carlisle (1953) bij *Lysmatia seticauda* en Lake (1970) bij *Chirocephalus diaphanus*.

De aanwezigheid van talrijke neurosecreetgranula in de XOSKT van hongerende dieren, in tegenstelling tot gevoede dieren, trekt de aandacht. In verband met de opgehoopte neurosecreten in de tractus naar de sinusklief bij hongerende dieren, is het waarschijnlijk dat hongeren fysiologische symptomen oproept, waarbij een vermindering van 'releasing' van neurosecreten zou plaatshebben. In de literatuur is met betrekking tot neurosecretorische regulaties bij Crustacea een dergelijk gegeven niet aanwezig. Voor Insecta, daarentegen, vermeldde Highnam et al. (1966, 1967) en Mordue (1967) een analoog verschijnsel bij *Schistocera gregaria* en *Tenebrio molitor*. Thomsen (1959) toonde evenwel een accumulatie van neurosecreet in de neurosecretorische cellen aan bij *Calliphora erythrocephala* na voedselopname en vermeldde later (Thomsen en Møller 1963) dat in deze toestand weinig neurosecreet vrijkomt. De invloed van hongeren of voedselopname op het neurosecreet van deze arthropoden (*S. gregaria*, *C. erythrocephala* en *T. molitor*) is echter duidelijk. Een vergelijkbaar systeem bij Crustacea mag niet worden uitgesloten. Het verschil in aantal acidofiel-reagerende neurosecretorische cellen in de lamina ganglionaris van *Astacus leptodactylus* zou een dergelijke bewering eveneens staven. De kreeften werden tijdens het onderzoek steeds in dezelfde omstandigheden gehouden. De enige variërende parameter was de voeding.

De histologie van een neurosecretorische cel is herhaaldelijk met haar activiteit in verband gebracht. Toepassing van alléén de histologische onderzoeksmethode op neurosecretorische cellen als indicatie van hun activiteit is, onder bepaalde omstandigheden, niet overtuigend (Highnam 1962, 1965, 1967; Mordue 1967). Het getelde aantal cellen met granula behoeft immers geen verband te houden met de geproduceerde hoeveelheden neurosecreet. De sterk actieve cellen zouden de pas gevormde granula onmiddellijk kunnen afgeven en daardoor nauwelijks als actief te kwalificeren zijn. Om deze redenen werd door ons naar andere criteria gezocht om neurosecretorische activiteiten na te gaan.

Kvistberg et al. (1966) maakte insuline na elektroforese op polyacrylamide-gels zichtbaar met paraldehyde-fuchsiene. De granula in β -cellen van de eilandjes van Langerhans werden selectief gekleurd volgens de paraldehyde-

fuchisine-methode (Gomori 1950, zie Gabe 1953). De combinatie van deze beide gegevens bracht ons ertoe de paraldehyde-fuchisine-kleuring voor polyacrylamide-gels aan te passen voor het neurosecretorisch materiaal in de oogsteel van *Astacus leptodactylus* (Van Herp et al. 1972), daar ook wij met dezelfde kleurmethode een soortgelijk resultaat vonden, namelijk PF-positieve banden in gels en PF-positieve granula in histologische coupes. Na disc-elektroforese van de oogsteelhomogenaten in een 15% polyacrylamide-gel en kleuring met PF werden zes banden aangetoond zowel bij hongerende als gevoede kreeften. Daar er grote individuele verschillen optreden in lokatie, dikte en intensiteit van de zes banden (ook binnen dezelfde groep) werden de gels densitometrisch doorgemeten bij 550 m μ of 580 m μ (Mander et al. 1968). De resultaten van de densitometrische bepaling waren echter niet zeer betrouwbaar, omdat de gelletjes tijdens het kleurproces melkachtig wit werden. Door 'pooling' van de extracten binnen dezelfde groep werden de individuele verschillen enigszins opgevangen. Met de door ons gevolgde methode is er geen opmerkelijk verschil tussen hongerende en gevoede dieren aantoonbaar. De resultaten van beide gebruikte methoden zouden aanvaardbaar een tegenstrijdige indruk kunnen maken.

Hierbij dient echter te worden opgemerkt dat bij de elektroferogram-methode alleen zure (basofiele) bestanddelen met paraldehyde-fuchisine zichtbaar gemaakt worden, in tegenstelling tot de histochemische methode waar door het zure Fast Green FCF van de trichroomkleurstof het basisch (acidofiel) reagerend neurosecretorisch materiaal wordt gekarakteriseerd. Vanuit dit oogpunt bezien, wijzen de resultaten wel in dezelfde richting, daar met behulp van de histochemische methode alleen in de basisch reagerende granula (lamina ganglionaris) tussen de twee voedingstoestanden een significant verschil optreedt.

De duidelijk waarneembare secreetgranula in de tractus naar de sinusklief bij hongerende dieren, in tegenstelling tot gevoede, konden met behulp van elektroforetische analyse niet achterhaald worden, ondanks het feit dat de meeste granula PF-positief reageerden in het histologisch preparaat. De mogelijkheid bestaat dat dit PF-positieve materiaal, afkomstig uit de tractus, in een of meerdere PF-positieve banden is opgenomen. Tot op heden is zulks kwantitatief niet identificeerbaar.

4.3. ONDERZOEK NAAR DE INVLOED VAN VERVELLINGSCYCLUS EN JAARGETIJD OP DE HYDROLASE-ACTIVITEIT IN HEPATOPANCREAS EN HEMOLYMFEN

4.3.1. Inleiding

Bij Decapoda treden belangrijke metabolische veranderingen op gedurende de vervellingscyclus. De chitinase-activiteit in de hepatopancreas van *Carcinus maenas* bereikt een hoogtepunt in stadium C₁ en daalt vervolgens in D₁ en D₂ (Jeuniaux 1960). De protease- en amylase-activiteiten vertonen bij dezelfde soort een minimum in A en B en een maximum in C, lage activiteiten zijn aanwezig in D₂ en D₃ (Bauchau en Mengeot 1965). Puyear (1969) constateerde bij *Callinectes sapidus* een verhoging van de nucleotidepyrofosfatase in stadium C, D₁ en D₂ en een verlaging van deze activiteit in D₃ en D₄.

Deze variaties staan vermoedelijk in verband met het staken en hervatten van de voedselopname. Kugler en Birkner (1948) toonden met behulp van histochemische methoden bij *Cambarus virilis* (= *Orconectes*) variaties aan in de alkalische fosfatase-activiteit van de hepatopancreas in samenhang met de vervellingscyclus, evenals Travis (1955; 1957) bij *Panulirus argus*. McWhinnie en Kirchenberg (1966) vonden bij *Orconectes virilis* twee maxima in de fosfatase-activiteit, waarvan één varieerde in functie van vervellingsstadium en jaargetijde. Hirsch en Jacobs (1928; 1930) stelden hogere amylase-, protease- en peroxidase-activiteiten vast in de hepatopancreas- en maagsap-extracten van *Astacus leptodactylus* gedurende de lente. Zij trachtten deze verschijnselen te correleren aan de verhoogde activiteit van deze dieren in de lente-zomer-periode.

Drach en Gabe (1962) toonden bij *Palaemon sp.* een verlaagde secretie aan in de neurosecretorische cellen van de pars ganglionaris in het x-orgaan tijdens vervellingsstadium A₂. Brown (1968) en Aiken (1969) wezen op de mogelijkheid dat alle variabele exogene factoren, zoals fotoperiodiciteit, temperatuur, jaargetijde e.a., ook bij Crustacea via neurale en/of hormonale weg hun invloed kunnen uitoefenen.

In de hiernavolgende experimenten werden:

- a) het hydrolasenpatroon van hepatopancreas en hemolymfe onderzocht met betrekking tot twee vervellingsstadia (A₂-B₁ en C) en
- b) de totale esterase- en fosfatase-activiteiten van hepatopancreas en hemolymfe nagegaan met betrekking tot twee jaargetijden (lente-zomer en herfst).

4.3.2. De invloed van de vervelling op de hydrolasen van hepatopancreas en hemolymfe

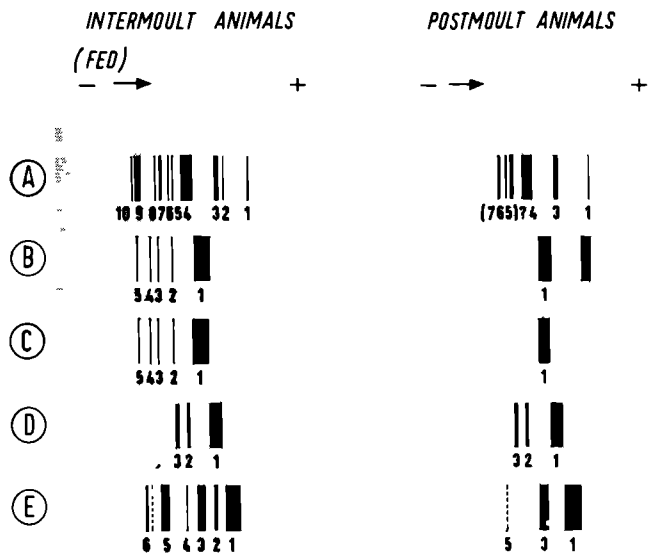
4.3.2.1. Materiaal en methoden

Om een indruk te krijgen van de veranderingen in de hydrolase-activiteiten van hepatopancreas en hemolymfe met betrekking tot de vervelling, werden de enzymatische activiteiten van 'postmoult' kreeften vergeleken met die van 'intermoult' kreeften. Hiertoe werd op de gebruikelijke wijze hemolymfe- en hepatopancreasmateriaal verzameld van mannelijke kreeften, die gedurende hun verblijf in het laboratorium vervelden en in vervellingsstadium A_2 tot B_1 verkeerden. Na verzameling werd het materiaal verder bewerkt voor elektroforetisch en spectrofotometrisch onderzoek, zoals uiteengezet in 3.1.2., respectievelijk 3.3.2.. De verkregen resultaten werden vergeleken met de gegevens van de gevoede kreeften (4.1.2.2.), die zich in vervellingsstadium C bevonden. De spectrofotometrische waarnemingen werden statistisch getoetst volgens de t-toets van Student voor twee steekproeven.

4.3.2.2. Resultaten

Ter vergelijking van de hydrolase-activiteiten in de hepatopancreas van 'postmoult' en 'intermoult' dieren, zijn in figuur 32 A t/m E de zymogrammen van de enzymatische activiteiten weergegeven. Terwijl de proteasen (D) een analoog bandenpatroon in de twee bestudeerde stadia vertonen, treden in de overige zymogrammen markante verschillen op. Bij de kreeften in stadium A_2 tot B_1 is in het zymogram van de 'alkalische' fosfatasen (C) alléén band 1 aantoonbaar en zijn de overige fracties (no.2, 3, 4 en 5) afwezig. Een dergelijk verschijnsel treedt ook op in het zymogram van de 'zure' fosfatasen (B): banden 2, 3, 4 en 5 zijn niet aantoonbaar, daarentegen verschijnt naast fractie 1 een nieuwe anodische band in het 'postmoult' stadium. Het amylasenzymogram (E) van de kreeften in het 'postmoult' stadium vertoont uitsluitend de banden 1, 3 en soms 5, terwijl de componenten 2, 4 en 6 ontbreken. Het α -naphthylacetaat wordt steeds door de esterase-actieve componenten 1, 3, 4 afgebroken en ook door wat vermoedelijk de banden 5, 6 en 7 zijn (A). Een tendens tot vermindering van het aantal hydrolase-actieve fracties in de hepatopancreas van kreeften in vervellingsstadium A_2 tot B_1 is ten opzichte van stadium C duidelijk aanwezig. Meestal kan tegelijkertijd ook een intensiteitsdaling van de resterende componenten worden geconstateerd. Bij de esterasen daarentegen zijn de drie meest kathodische fracties (vermoedelijk 5, 6 en 7) actiever.

In tabel 18 worden voor de hydrolasen van de hepatopancreas de gemiddelde activiteitswaarden in de overeenkomstige activiteitseenheden aangegeven voor kreeften in de beide onderzochte stadia. Tevens zijn in deze tabel



- (A) zymogram of the esterases
(substrate: α -naphthyl acetate pH 8.0)
- (B) zymogram of the „acid” phosphatases
(substrate: Na- α -naphthyl phosphate pH 5.0)
- (C) zymogram of the „alkaline” phosphatases
(substrate: Na- α -naphthyl phosphate pH 8.6)
- (D) zymogram of the proteases
(substrate: gelatin pH 8.9)
- (E) zymogram of the amylases
(substrate: starch pH 5.6)

Fig.32. Zymograms of the hepatopancreas hydrolases from intermoult and postmoult crayfishes

Fig.32 Zymogrammen van de hepatopancreashydrolasen bij 'intermoult' en 'postmoult' rivierkreeften

de standaarddeviatie van de verschillende metingen en de grootste en kleinste activiteitswaarde opgenomen evenals de toetsresultaten na toepassing van de Student's t-toets voor twee steekproeven.

TABEL 18

Hydrolase-activiteiten in de hepatopancreas van 'postmoult' en 'intermoult' kreeften

Enzym	V	n	\bar{x}	s	t	Toets- resul- taat	Activiteits- waarden	
							max	min
zure fosfatasen	A ₂ -B ₁	6	13,49	4 12	1,45	(*)	21,91	10,11
	C	13	17,66	6,35			26,47	9,84
alkalische fosfatasen	A ₂ B ₁	6	1,81	0,74	3,82	**	3,17	1,12
	C	13	7,74	3,70			15,78	0,30
esterasen	A ₂ -B ₁	6	1,22	0,33	0,26	n s	1,65	0,81
	C	11	1 17	0,40			1,84	0,62
amylasen	A ₂ -B ₁	6	67,00	25,41	1 52	(*)	36,00	102,00
	C	6	90,50	27,92			132,50	53,00
proteasen	A ₂ B ₁	6	3 43	1 15	4,26	**	5,25	2,01
	C	11	6 94	1,81			9,62	2,81

V vervellingsstadium A₂ tot B₁ (= postmoult) en C (= intermoult)

n aantal verwerkte dieren

 \bar{x} rekenkundig gemiddelde van de enzymactiviteiten in activiteitseenheden, overeenkomstig 3.3

s standaarddeviatie van de metingen

t toetsingsgrootheid van de t-toets van Student voor twee steekproeven

activiteitswaarden max / min grootste respectievelijk kleinste gemeten activiteitswaarden

Uit de gegevens blijkt dat er geen significante wijziging in de esterase-activiteit optreedt, doch wel geringe significante veranderingen in de 'zure' fosfatase- en de amylase-activiteit aantoonbaar zijn. Bij 'postmoult' dieren vindt een zeer significante daling plaats in de 'alkalische' fosfatase- en de protease-activiteit.

Bij vergelijking van de stadia A₂-B₁ met C komen in het heterogeen patroon van de onderzochte hydrolase-activiteiten van de hemolymfe minder aperte verschillen voor, zoals aangegeven in figuur 33 A t/m D. Het zymogram van de 'alkalische' fosfatasen (C) is in beide vervellingsstadia nagenoeg identiek. Bij de 'zure' fosfatasen (B) treden in het 'postmoult' stadium eveneens twee kathodische banden op na hydrolyse van Na- β -glycerofosfaat. Hun intensiteit is echter veel sterker. α -Naphthylbutyraat (A) is in dit stadium door drie esterase-actieve fracties (3, (4) en 5) hydrolyseerbaar. Terwijl in het 'intermoult' stadium zetmeel (D) door twee zeer actieve (1 en 5) en vier zwakke (2, 3, 4 en 6) amylasefracties wordt gesplitst, zijn in het 'postmoult' stadium alleen de fracties 1, 2 en 5 aantoonbaar. Bovendien is de activiteit

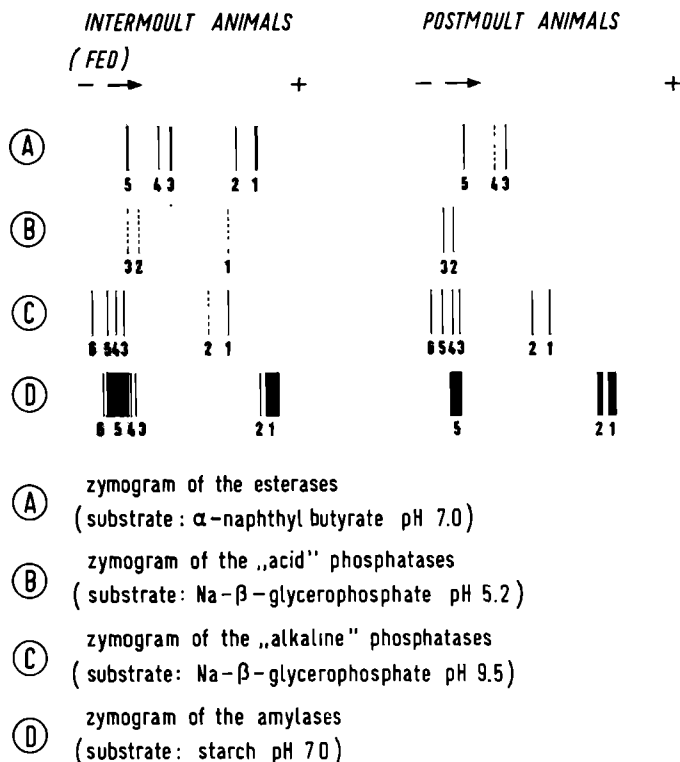


Fig.33. Zymograms of the hemolymph hydrolases from intermoult and postmoult crayfishes

Fig.33. Zymogrammen van de hemolymfehydrolasen bij 'intermoult' en 'postmoult' rivierkreeften

van fractie 5 afgenomen, terwijl die van fractie 2 sterk is toegenomen.

In tabel 19 zijn de spectrofotometrische enzymatische activiteitsbepalingen in de hemolymfe weergegeven. Alleen bij de 'zure' fosfatase- en amylase-activiteiten is een significante respectievelijk zeer significante stijging waarneembaar in de hemolymfe van kreeften, die zich in het 'postmoult' stadium bevinden. 'Alkalische' fosfasen en esterassen zijn daarentegen in de beide vervellingsstadia niet significant verschillend.

4.3.2 3. Discussie

Ten opzichte van het 'intermoult' stadium (C) neemt tijdens het 'postmoult' stadium (A₂ tot B₁) het aantal hydrolase-actieve componenten in de

TABEL 19

Hydrolase-activiteiten in de hemolymfe van 'postmoult' en 'intermoult' kreeften

Enzym	V	n	x	s	t	Toets resultaat	Activiteits- waarden	
							max	min
zure fosfatasen	A ₂ -B ₁	6	1,34	0,88	2,28	*	2,38	0,50
	C	12	0,70	0,34			1,34	0,19
alkalische fosfatasen	A ₂ -B ₁	6	7,07	4,38	0,66	n s	11,53	2,13
	C	12	5,67	4,12			11,76	1,13
esterasen	A ₂ -B ₁	6	0,85	0,38	1,00	n s	1,45	0,47
	C	10	0,70	0,23			0,98	0,28
amylasen	A ₂ -B ₁	6	10 02	5 23	3,50	**	19,67	5,88
	C	8	3,19	1,67			6,41	1,70

V vervellingsstadium A₂ tot B₁ (= postmoult) en C (= intermoult)

n aantal verwerkte dieren

x rekenkundig gemiddelde van de enzymactiviteiten in activiteitseenheden, overeenkomstig 3.3

s standaarddeviatie van de metingen

t toetsingsgrootte van de t-toets van Student voor twee steekproeven

activiteitswaarden max / min grootste respectievelijk kleinste gemeten activiteitswaarden

hepatopaneas van *Astacus leptodactylus* duidelijk af. De tendens tot afname is, met uitzondering van de esterases, ook in de totale activiteitsbepalingen van de onderzochte hydrolasen waarneembaar.

Het is mogelijk dat dit verschijnsel nauw samenhangt met de afwezigheid van een stimulerende of conserverende factor in de oogsteel. Drach en Gabe (1962) toonden bij *Palaemon sp.* een verlaagde secretie aan van de neurosecretorische cellen van de pars ganglionaris in het x-orgaan tijdens stadium A₂. Fingerman et al (1967) en Van Wormhoudt et al (1972) vonden na ablatie van de oogstelen bij *Procambarus clarkii* respectievelijk *Palaemon serratus* en *Palaemon kerathurus* een lagere amylase- en protease-activiteit. Onze resultaten, vermeld in 4.2.2, wijzen in dezelfde richting. Als zodanig zijn de zymogrampatronen in stadium A₂ tot B₁ nagenoeg identiek aan die van de proefdieren, waarvan de sinusklieren werden geëxtirpeerd (fig. 24).

Bij *Palaemon serratus* (Van Wormhoudt 1972) en *Carcinus maenas* (Bauchau en Mengeot 1965) werden in stadium A tot B minimale amylase-, protease- en arginase-activiteiten aangetoond. Door Bauchau en Mengeot, en in mindere mate door Van Wormhoudt, wordt deze daling in enzymatische activiteit voornamelijk toegeschreven aan de hongerperiode, welke de meeste

Crustacea gedurende het 'premoult' en 'postmoult' stadium ondergaan. In tegenstelling hiermee constateerden wij bij *Astacus leptodactylus* reeds een voedselopname aan het einde van vervellingsstadium A. Dientengevolge kunnen de veranderingen, waargenomen bij het door ons gebruikte proefdier, niet aan een hongerperiode worden toegeschreven. Hongeren of voeden heeft immers weinig invloed op de hydrolasenpatronen (4.1). Het is mogelijk dat in stadium B de stimulerende werking, uitgaande van de neuroendocriene centra van de oogsteel, weer wordt hervat. Het niet significante verschil van de totale esterase-activiteit tussen de vervellingsstadia A_2 - B_1 en C zou hierdoor kunnen worden verklaard. Sinuskliertextirpatie veroorzaakt een extreme stijging van de esterase-activiteit in de hepatopancreas van *Astacus leptodactylus*, zodat ook na hervatting van de regulerende werking in het 'postmoult' stadium een daling tot het normale peil te verwachten is. Een verklaring voor de activiteitstoename van de afzonderlijke esterase-actieve componenten (5, 6 en 7) kan niet worden gegeven.

Ook in de hemolymfe variëren de hydrolase-activiteiten in correlatie met de vervellingscyclus. In tegenstelling tot de hepatopancreas zijn in het 'postmoult' stadium hogere 'zure' fosfatase- en amylase-activiteiten aantoonbaar in de hemolymfe van *Astacus leptodactylus*. Esterasen en 'alkalische' fosfasen vertonen in dit stadium activiteiten, die vergelijkbaar zijn met die van het 'intermoult' stadium. Ofschoon het aantal hydrolase-actieve componenten in het 'postmoult' stadium afneemt (b.v. esterassen en amylasen), is er een tendens tot toename van de activiteit der afzonderlijke fracties (b.v. 'zure' fosfasen/no 2 en 3 en amylasen/band 2) waarneembaar. Activiteitsschommelingen van de hemolymfhydrolasen met betrekking tot de vervellingscyclus zijn tot nu toe bij Crustacea niet waargenomen. De belangrijke glycoeenverschuivingen van o.a. hepatopancreas naar integument (o.a. Renaud 1949, Travis 1955) impliceren een verhoogde hydrolytische en fosforolytische activiteit. Wellicht staan de verhoogde amylase- en fosfatase-activiteiten in de hemolymfe hiermee in verband.

4.3.3. De invloed van het jaargetijde op de hydrolasen van hepatopancreas en hemolymfe

4.3.3.1. Materiaal en methoden

Om de seizoensinvloed op de hydrolase-activiteiten van hepatopancreas en hemolymfe na te gaan, werden in de lente-zomerperiode (juni) en herfstperiode (oktober) kreeften geselecteerd naar geslacht (δ), gewicht (70 a 100 g) en vervellingsstadium (C) en in de proefopstelling ondergebracht. Na 21 dagen hongeren werd het hemolymfe- en hepatopancreasmateriaal op de

gebruikelijke wijze verzameld en bewerkt voor spectrofotometrisch onderzoek, zoals beschreven in 3.3.2.. Daar wij slechts een globale indruk wilden verkrijgen van de seizoensinvloeden, werden alleen de totale esterase-, 'zure' en 'alkalische' fosfatase-activiteiten bepaald. De gegevens werden statistisch getoetst volgens de Student's t-toets voor twee steekproeven.

TABEL 20
Hydrolase-activiteiten in de hepatopaneas van 'lente-zomer' en 'herfst' dieren

Enzym	Jaar-ge-tijde	n	\bar{x}	s	P_{t_2} (%)	Toets-resul-taat	Activiteits-waarden	
							max.	min.
zure fosfasaten	L-Z	13	17,40	7,38	0,0	**	31,40	5,35
	H	17	8,48	3,75			18,27	4,36
alkalische fosfasaten	L-Z	12	8,00	6,54	0,0	**	21,39	2,75
	H	17	2,28	1,61			6,96	0,72
esterasen	L-Z	11	1,15	0,49	0,0	**	1,95	0,35
	H	17	2,36	0,80			4,40	0,80

jaargetijde : L-Z = lente-zomerperiode; H = herfstperiode

n : aantal verwerkte dieren

\bar{x} : rekenkundig gemiddelde van de enzymactiviteiten in activiteitseenheden, overeenkomstig 3.3.

s : standaarddeviatie van de metingen

P_{t_2} (%) : tweezijdige overschrijdingskans volgens de t-toets van Student voor twee steekproeven (in procenten)

activiteitswaarden max./min. : grootste respectievelijk kleinste gemeten activiteitswaarden

4.3.3.2. Resultaten

De resultaten van de hierboven vermelde hydrolase-activiteiten in de hepatopaneas zijn voor beide jaargetijden weergegeven in tabel 20. Naast de gemiddelde activiteitswaarden zijn tevens de standaarddeviatie, de tweezijdige overschrijdingskans, de toetsresultaten en de grootste en kleinste gemeten activiteitswaarden in de tabel opgenomen. Hieruit blijkt duidelijk dat er een relatie bestaat tussen het seizoen en de onderzochte hydrolase-activiteiten in de hepatopaneas. Terwijl de 'zure' en 'alkalische' fosfatase-activiteiten in de herfstperiode een zeer belangrijke daling ondergaan ten opzichte van de lente-zomerperiode, vertoont de esterase-activiteit een zeer significante stijging bij overgang van de lente-zomerperiode naar de herfst.

Belangrijke veranderingen van de hydrolase-activiteiten in de hemolymfe in samenhang met de jaargetijden werden in dit experiment niet geconsta-

teerd. De drie onderzochte hydrolasen vertoonden zowel in de herfst als in de lente-zomerperiode nagenoeg dezelfde gemiddelde activiteitswaarden:

'zure' fosfasen:	0,82 mMol 'zure' fosfatase-eenheden/testvolume;
'alkalische' fosfasen:	5,39 mMol 'alkalische' fosfatase-eenheden/testvolume;
esterasen:	$0,81 \cdot 10^{-6}$ mM p-nitrophenol/min/testvolume.

4.3.3.3. Discussie

Verscheidene fysiologische aspecten van de hepatopaneas vertonen veranderingen die samenhangen met jaargetijden en vervellingsstadia. Seizoensinvloeden werden bij *Orconectes virilis* geconstateerd in het zuurstof- en substraatverbruik (McWhinnie en Kirchenberg 1962; McWhinnie en Chua 1964; McWhinnie en Corkill 1964). Variaties werden ook aangetoond bij incorporatie van L-leucine- $1-^{14}\text{C}$ in het hepatopaneasweefsel (McWhinnie en Mohrher 1970). In 1966 vonden McWhinnie en Kirchenberg twee activiteitsmaxima in de 'alkalische' fosfatase-activiteit bij dezelfde soort. Overeenkomstig deze resultaten constateerden wij bij *Astacus leptodactylus* veranderingen in de hydrolase-activiteiten van de hepatopaneas. Terwijl de fosfasen in activiteit dalen, stijgen de esterasen bij overgang van lente-zomer naar herfst.

Fysiologische veranderingen ten gevolge van het seizoen hangen waarschijnlijk samen met neuroendocriene systemen. Milieufactoren als fotoperiodiciteit, temperatuur en geomagnetisme blijken de biologische ritmen te beïnvloeden en kunnen op verschillende perioden van dag-, maand- en jaarcyclus inwerken (Brown 1968; Aiken 1969).

In beide jaargetijden (lente-zomer en herfst) werden de experimenten onder gelijke omstandigheden uitgevoerd (permanente donkerperiode, watertemperatuur van 12 à 14°C etc.) en werden de proefdieren aan een verplichte hongerperiode onderworpen. Bijgevolg moet de invloed van deze factoren op de hydrolase-activiteiten worden uitgesloten. De veranderingen zijn vermoedelijk te wijten aan seizoengebonden variaties in levensprocessen, die waarschijnlijk langs neurohormonale weg worden geregeld. Misschien hangt een en ander samen met de groei van de gonaden, die duidelijke seizoensverschillen vertoont.

Hirsch en Jacobs wezen in 1930 reeds op veranderingen in amylase- en protease-activiteiten van de hepatopaneas bij *Astacus leptodactylus* onder invloed van seizoenwisselingen.

Omtrent de relatie tussen endocriene systemen en milieufactoren (o.a. fotoperiodiciteit) bij Crustacea is weinig onderzoek verricht. Teneinde de grote achterstand ten opzichte van de Vertebraten in te halen, is verder onderzoek gewenst.

SAMENVATTING EN CONCLUSIES

Fosfatase-, esterase-, amylase- en protease-activiteiten in hepatopaneas en hemolymfe van de rivierkreeft, *Astacus leptodactylus*, werden fysiologisch, biochemisch en histochemisch onderzocht.

1. LOKALISATIE VAN DE HYDROLASE-ACTIVITEITEN

a. *Hepatopaneas*

Met behulp van histochemische methoden werden de activiteiten van esterases, fosfatasen en proteasen in de tubuli van de hepatopaneas gelokaliseerd (2.1.). De associatie van de esterase-, 'zure' en 'alkalische' fosfatase-activiteiten met de microvilli van F-, B- en in het bijzonder R-cellen wijst op de rol van deze enzymen bij het transport van kleine metabolieten tussen cel en tubuluslumen. De positieve reactie van bovengenoemde enzymen langs de vacuolemembraan in de B-cel duidt waarschijnlijk ook op een uitwisseling van producten tussen het cytoplasma en de secrethoudende vacuole. De fosfatasewerking rond de calcosferieten wijst erop dat ook bij *Astacus leptodactylus* deze enzymen bij het transport van calcosferieten betrokken zijn. De protease-activiteit in de grote vacuolen van de B-cellen onderstreept de secretiefunctie, die aan de B-cellen wordt toegekend.

De differentiële lokalisatie van de onderzochte hydrolase-activiteiten houdt verband met de verschillende fysiologische functies van deze enzymen. Niet-specifieke esterases en fosfatasen functioneren in de zogenaamde contactvertering en vergemakkelijken de absorptie van kleine verteringsmetabolieten door o.a. de microvilli; proteasen (en wellicht ook amylasen) hebben hun hoofdfunctie bij de afbraak van grotere metabolieten in de maag en functioneren als zodanig in de lumenale vertering. Met behulp van histochemische methoden kunnen geen veranderingen in lokalisatie of activiteit van de hydrolasen onder invloed van variërende fysiologische omstandigheden worden waargenomen.

b. Hemolymfe

Experimenteel duidt niets op de aanwezigheid van hydrolasen in de bloedcellen van *Astacus leptodactylus* (2.2.). De esterase- en fosfatase-activiteiten kunnen alleen in serum of plasma worden aangetoond. Evenals bij de Mammalia, zijn de enzymen in de bloedvloeistof van *Astacus leptodactylus* waarschijnlijk uit andere weefsels afkomstig. Daar de hepatopaneas de belangrijkste enzymbron is, moet in de eerste plaats aan deze klier worden gedacht. Een actieve rol van deze enzymen in de hemolymfe mag niet worden uitgesloten. In verband hiermede zouden de verhoging van de totale esterase-activiteit en het optreden van nieuwe esterase-actieve componenten 6 uur na voedselopname een rol kunnen spelen bij het zogenaamde 'clearing-effect' in het bloed (4.1.3.).

2. HETEROGENITEIT, SUBSTRAATAFFINITEIT EN EFFECTOREN VAN DE HYDROLASEN (3.1.)

a. Hepatopaneas (en maagsap)

In 4% butanolextracten van de hepatopaneas en in waterige maagextracten kunnen na disc-elektroforese met een acrylamideconcentratie van 7,5% pH 8,9, maximaal tien respectievelijk twaalf esterase-actieve componenten worden aangetoond (met α -naphthylacetaat als substraat). In het hepatopaneasextract zijn, zowel in het zure als het alkalische pH-gebied, vijf fosfatase-actieve fracties aanwezig; in het maagsap zijn daarentegen slechts drie 'zure' fosfatase-actieve componenten geconstateerd (met Na- α -naphthylfosfaat als substraat). Bij dezelfde acrylamideconcentratie treden in beide extracten zes amylase-actieve componenten op (met zetmeel als substraat). Drie proteasebanden zijn aantoonbaar bij een acrylamideconcentratie van 15% bij pH 8,9 (met gelatine als substraat).

De esterolytische enzymen van de hepatopaneas behoren tot de groep der aliesterasen op grond van hun substraataffiniteit tot laagmoleculaire vetzure esters en hun gevoeligheid voor diisopropylfluorofosfaat (DFP). Een exacte karakterisering van de hepatopaneasfosfasen kan niet worden gegeven: in het basische pH-gebied worden ze, evenals de fosfasen in de zoogdierdarm, geïnhibeerd door ethyleendiaminetetraacetaat (EDTA) en L (+) cysteïne; in het zure pH-gebied remt L (+) wijnsteen zuur. De invloed van enkele natuurlijke inhibitoren (sojabonen-inhibitor, ovomucoïd, Trasylol®, α_1 -antitrypsine, humanserum en Astacuserum) en synthetische inhibitoren (diisopropylfluorofosfaat (DFP), N- α -p-tosyl-L-lysinechloromethylketone (TLCK) en tosylphenylalaninchloromethylketone (TPCK)) toont duidelijk aan, dat twee van de drie protease-actieve componenten in de

hepatopaneas een trypsine-achtig karakter bezitten. De derde fractie kon in onze experimenten alleen met vers kreefteserum worden geremd. Er is niets bekend over de aanwezigheid van een natuurlijke inhibitor in het bloed van Crustacea. Uit inhibitieproeven met CuSO_4 , CuCl_2 + ascorbinezuur en ureum rijst het vermoeden, dat zowel α - als β -amylasen in de hepatopaneas aanwezig zijn.

b. Hemolymfe

In de hemolymfe zijn maximaal vijf esterase- (met α -naphthylbutyraat als substraat) en zes amylase- (met zetmeel) actieve fracties aantoonbaar. In een basisch pH-gebied treden twee fosfatase-actieve componenten op, in een zuur milieu zijn drie componenten (met Na- α -naphthylfosfaat als substraat) zichtbaar. Proteasen kunnen in de hemolymfe niet worden aangetoond.

De moleculaire heterogeniteit van de esterasen in de hemolymfe is maximaal bij propionaat en butyraat als substraat. Ethyleendiaminetetraacetaat (EDTA) en eserinesulfaat hebben een remmende werking. Deze esterasen behoren blijkbaar tot de groep der aliesterasen. De gevoeligheid van de hemolymfefosfasen ten opzichte van EDTA, L (+) cysteine en L (+) wijnsteen-zuur is analoog aan die van de hepatopaneasfosfasen. Inhibitieproeven met kopercomplexen en ureum betreffende de amylase-activiteit van de hemolymfe wijzen in de richting van α -amylasen.

3. GELFILTRATIE VAN DE HEPATOPANCREASFOSFATASEN

Na gelfiltratie over zure (0,1 M citraatbuffer pH 5,6 + 1 M NaCl) en alkalische (0,1 M Tris/HCl + 1 M NaCl) Sephadex G-200 kolommen, kan slechts één fosfatase-activiteitspiek worden aangetoond (3.2.). p-Nitrophenylfosfaat wordt door de geleluaten gehydrolyseerd zowel in zuur als in alkalisch milieu. Het optreden van twee gescheiden activiteitspieken bij pH 5,6-6,0 en pH 8,4-8,8 bevestigt de werking van het enzym in een breed pH-gebied.

4. INVLOEDRIJKE EXOGENE EN ENDOGENE FACTOREN

Onder invloed van variërende exogene en endogene factoren treden in de hydrolase-activiteiten van hepatopaneas en hemolymfe enkele belangrijke veranderingen op (4.).

a. Voeden en hongeren

Bij kreeften in het 'intermoult' stadium treden tijdens een hongerperiode

van 21 dagen geen kwantitatieve veranderingen op in de hydrolase-activiteiten van hepatopancreasextracten en hemolymfe. Het gering variërende zymogrampatroon van deze hydrolasen voor hepatopancreas en hemolymfe stemt hiermee overeen (4 1 2).

In aansluiting op deze experimenten werd de invloed van voeding en hongeren op het neurosecretorisch systeem van de oogsteel nagegaan met behulp van histochemische en elektroforetische methoden (4 2 3). Een groter aantal acidofiele neurosecreethoudende cellen in de lamina ganglionaris en de aanwezigheid van talrijke neurosecreetgranula in de x-orgaansinuskliertractus werden onder invloed van een hongerperiode vastgesteld. Onafhankelijk van de voedingstoestand veranderen echter de kleureigenschappen van het neurosecreet tijdens het transport via de verschillende axonen.

De invloed van een korte voedingsperiode, volgend op een lange hongerperiode, op het hydrolasenpatroon van hepatopancreas en hemolymfe werd in 4 1 3 beschreven. Daarbij is vastgesteld dat in de hepatopancreas geen markante verschillen in aantal en activiteit der hydrolasefracties optreden. In de hemolymfe treden daarentegen bij deze experimenten zowel fluctuaties op in het aantal esterase-actieve componenten als in de totale esterase-activiteit. Fluctuaties in de amylase-activiteit zijn eveneens aantoonbaar.

b Sinuskliextirpatie

De invloed van sinuskliextirpatie op het hydrolasenpatroon van gevoede en hongerende dieren werd als voorbeeld van een mogelijk invloedrijke interne factor bestudeerd (4 2 2). Belangrijke veranderingen in de hydrolase-activiteiten van de hepatopancreas treden 21 dagen na verwijdering van de sinusklier op. De invloed van dit neurohemaal orgaan mag echter niet met betrekking tot alle enzymen gegeneraliseerd worden: de protease- en amylase-activiteiten nemen belangrijk af, de gevolgen van de extirpatie voor de fosfatase-activiteit zijn daarentegen gering, terwijl de esterase-activiteit ten slotte aanzienlijk stijgt. Een selectieve invloed van de sinusklier op de heterogeniteit van de bestudeerde hydrolasen is evident. Het samengaan van deze selectieve werking met andere metabolische veranderingen wordt niet uitgesloten. Zo staat wellicht het verdwijnen van drie amylase-actieve fracties in verband met veranderingen in het kopermetabolisme. Het optreden van een nieuwe, uiterst actieve fosfatasefractie in het zure en alkalische pH-gebied gaat waarschijnlijk gepaard met de voorbereiding op de vervelling.

De tendens tot afname van de onderzochte hydrolase-activiteiten in de hemolymfe, met uitzondering van de esterases die onveranderd blijven na sinuskliextirpatie, wijst op een causale relatie tussen deze klier en de enzymactiviteit in de hemolymfe. Uitgaande van de veronderstelling dat de

enzymen in de hemolymfe afkomstig zijn uit andere weefsels, werkt de sinusklief waarschijnlijk indirect via de hepatopaneas.

c. Vervelling en jaargetijde

Veranderingen in de hydrolase-activiteiten in samenhang met vervellingscyclus en jaargetijde werden beschreven in 4.3.. In vergelijking met vervellingsstadium C neemt het aantal hydrolase-actieve componenten, evenals de totale onderzochte enzymactiviteiten in de hepatopaneas, gedurende vervellingsstadium A₂ tot B₁ af (4.3.2.). Een relatie tussen dit verschijnsel en de hormonale veranderingen, die bij vervelling optreden, is evident. De analogie tussen de zymogrampatronen van de hepatopaneas in stadium A₂ tot B₁ en die van kreeften zonder sinusklief staven deze bewering, daar de sinuskliefactiviteit bij vervelling over het algemeen daalt. In tegenstelling tot de hepatopaneas zijn in de hemolymfe van 'postmoult' kreeften hogere 'zure' fosfatase- en amylase-activiteiten aantoonbaar. De belangrijke verschuivingen in glycogeenopslag van o.a. hepatopaneas naar integument impliceren een verhoogde hydrolytische (amylolytische en fosforolytische) activiteit.

De overgang van lente-zomer naar herfst veroorzaakt belangrijke veranderingen in de esterase- en fosfatase-activiteiten van de hepatopaneas (4.3.3.). Deze zijn te vergelijken met de desbetreffende veranderingen bij sinuskliefextirpatie. Hieruit rijst het vermoeden dat de seizoeninvloed samenhangt met veranderingen in het neuroendocriene systeem.

Op grond van het bovenstaande kan gesteld worden, dat ofwel de jaargetijden, als externe parameter, via het neurosecretorisch systeem van de oogsteel veranderingen in de hydrolase-activiteiten oproepen, die op hun beurt gepaard gaan met de vervelling, of dat de jaargetijden via het neurosecretorisch systeem de vervelling induceren, hetgeen veranderingen in de hydrolasen teweegbrengt.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

Phosphatase, esterase, amylase and protease activities of the hepatopancreas and the hemolymph of the crayfish, *Astacus leptodactylus*, were studied from the physiological, biochemical and histochemical point of view

1 LOCALIZATION OF THE HYDROLASE ACTIVITIES

a Hepatopancreas

The activities of esterases, phosphatases and proteases were localized in the tubules of the hepatopancreas with histochemical methods (21) The association of the esterase, 'acid' and 'alkaline' phosphatase activities with the microvilli of the F-, B- and especially the R-cells points to the role of these enzymes in the transport of small metabolites between the cell and the tubule lumen The positive reaction of the esterases and phosphatases along the vacuole membrane of the B-cell suggests an exchange of substances between the cytoplasm and the secretory vacuole The phosphatase activity around the calcospherites indicates that like in other Crustacea, this enzyme is involved in the transport of calcospherites The protease activity in the large vacuoles of the B-cells underlines the secretory function, which is ascribed to this cell type

The differential localization of the aforementioned hydrolase activities is in agreement with the different physiological functions of these enzymes non-specific esterases and phosphatases function in the so-called 'membrane-digestion' and facilitate the absorption of relatively small size digestion metabolites by the microvilli, proteases (and perhaps also the amylases) are involved primarily in the degradation of large size metabolites in the stomach They act as such in the so-called 'luminal digestion' No changes can be detected histochemically in the localization or the activity of the hydrolases under various physiological conditions

b. Hemolymph

There is no experimental evidence for the presence of hydrolases in the blood cells of *Astacus leptodactylus* (2.2.). The esterase and phosphatase activities can only be demonstrated in serum or plasma. As in mammals, the enzymes in the blood fluid of *Astacus leptodactylus* probably originate in other tissues. Because the hepatopancreas is the most important enzyme source, this gland must be considered in the first place.

An active role of esterases, phosphatases and amylases in the hemolymph may not be excluded. In correlation with this, the increase of the total esterase activity as well as the appearance of new esterase active components six hours after feeding might be functional in a so-called 'clearing-effect' in the blood (4.1.3.).

2. HETEROGENEITY, SUBSTRATE AFFINITY AND EFFECTORS OF THE HYDROLASES (3.1.)

a. Hepatopancreas (and gastric juice)

In 4% butanol extracts of the hepatopancreas and in diluted gastric juice up to ten respectively twelve α -naphthyl acetate esterases can be visualized after disc-electrophoresis with an acrylamide concentration of 7.5%, pH 8.6. In hepatopancreas extracts five phosphatase active fractions are present in the acid as well as in the alkaline pH range; in gastric juice, on the other hand, only three 'acid' phosphatase active components could be demonstrated with Na- α -naphthyl phosphate as substrate. At the same acrylamide concentration six amylase components appear both in the hepatopancreas and in gastric juice using starch as a substrate. Their mobilities are the same in both cases. Three protease bands are visualized at an acrylamide concentration of 15% and a pH of 8.9, with gelatin as substrate.

On the basis of their affinity for low molecular fatty acid esters and their sensitivity to diisopropylfluorophosphate (DFP), the hepatopancreatic esterolytic enzymes belong to the category of the aliesterases. An exact characterization of the hepatopancreatic phosphatases can not be given: in the alkaline pH range they are inhibited by ethylenediaminetetraacetate (EDTA) and by L (+) cysteine. They are as such comparable to the phosphatases in the mammalian intestine; in the acid pH range, L (+) tartaric acid acts as an inhibitor. The influence of some natural inhibitors (soybean trypsin inhibitor, ovomucoid, Trasylol®, α_1 -antitrypsin, serum from emphysema patients and *Astacus* serum) and synthetic inhibitors (diisopropylfluorophosphate (DFP); N- α -p-tosyl-L-lysinechloromethylketone (TLCK) and tosylphenyl alaninechloromethylketone (TPCK)) leads to the conclusion that two

out of the three protease active components in the hepatopancreas are trypsinlike enzymes. In our experiments the third fraction could only be inhibited by fresh crayfish serum. There are no data in the literature about the presence of a natural protease inhibitor in the blood of Crustacea. Inhibition experiments with CuSO_4 , CuCl_2 + ascorbic acid and urea suggest that α - and β -amylases are present in the hepatopancreas.

b. Hemolymph

Up to five esterase (with α -naphthyl butyrate as substrate) and six amylase (with starch as substrate) active fractions are demonstrated in the hemolymph. Two phosphatase components are visualized at an alkaline pH. In the acid pH range three components appear with Na- α -naphthyl phosphate as substrate. Proteases can not be detected in the hemolymph.

The molecular heterogeneity of the esterases in the hemolymph is highest with propionate and butyrate as substrates. Ethylenediaminetetraacetate (EDTA) and eserine sulfate are inhibitors, which seems to indicate that these esterases belong to the category of aliesterases. The sensitivity of the hemolymph phosphatases to EDTA, L (+) cysteine and L (+) tartaric acid is similar to that of the hepatopancreatic phosphatases. Inhibition experiments with Cu^{++} and urea suggest that the amylolytic activity of the hemolymph must be ascribed to α -amylases.

3. GEL FILTRATION OF THE HEPATOPANCREATIC PHOSPHATASES

After gel filtration on acid (0.1 M citrate buffer pH 5.6 + 1 M NaCl) and alkaline (0.1 M Tris/HCl + 1 M NaCl) Sephadex G-200 columns only one phosphatase active component appears in the eluates. p-Nitrophenylphosphate is hydrolysed by the gel eluates both acidic and alkaline medium. The appearance of two distinct activity peaks at pH 5.6-6.0 and 8.4-8.8 supports the idea that the enzyme is active over a wide pH range.

4. INFLUENCE OF EXOGENIC AND ENDOGENIC FACTORS

Under the influence of variable exogenic and endogenic factors some important changes in the hydrolase activity of the hepatopancreas and hemolymph (4.) become apparent.

a. Feeding and starvation

During a starvation period of 21 days there are no quantitative changes in the hydrolase activities of the hepatopancreas and the hemolymph of inter-

moult crayfishes. The negligible variations in the zymogram pattern of these hepatopancreatic and hemolymph hydrolases confirm this result (4.1.2.). In connexion with these experiments the influence of feeding and starvation on the neurosecretory in the eyestalk was examined with histochemical and electrophoretic methods (4.2.3.). Following starvation, a higher number of acidophilic neurosecretory cells were detected in the lamina ganglionaris and numerous neurosecretory granules were seen in the x-organ-sinus gland-tract. Independently of the feeding condition, the colour characteristics of the neurosecretory material change during their transport along the axons.

The influence of a short feeding period on the hepatopancreatic and hemolymph hydrolase pattern following a long starvation period is described in 4.1.3.. Clear cut differences in number and activity of the hydrolase fractions in hepatopancreas extracts are absent. In the hemolymph, however, fluctuations appeared in the number of active components and in the total esterase activity. The amylase activity also fluctuates.

b. Sinus gland extirpation

The influence of sinus gland extirpation on the hydrolase pattern of fed and starved animals was investigated as a potential internal factor (4.2.2.). Important changes in the hydrolase activity of the hepatopancreas appear 21 days after extirpation of the sinus gland. Generalization of the influence of this neurohemal organ on all the enzymes which were studied is not possible, as the protease and amylase activities decline considerably and the effect of sinus gland extirpation on the phosphatase activity is minimal while the esterase activity actually shows an important increase. A selective influence of the sinus gland on the heterogeneity of the hydrolases is evident. A correlation of this selective effect with other metabolic changes is not excluded, e.g. the disappearance of three amylase active fractions is possibly related to changes in copper metabolism. The appearance of a new and very active phosphatase fraction in the acid and alkaline pH region is probably related to the initiation of moulting.

The tendency of the hydrolase activities in the hemolymph to regress (with the exception of the esterases which do not change after sinus gland extirpation) indicates a causal relationship between this gland and the enzymatic activity in the hemolymph. Assuming that hemolymph enzymes derive from other tissues, the sinus gland discharged this function probably indirect via the hepatopancreas.

c. Moults-cycle and season

Changes in the hydrolase activities in correlation with the moult-cycle and season are described in 4.3.. Compared with moult stage C, the number of

hydrolase active components as well as the total enzymatic activities in the hemolymph decline during stage A_2-B_1 (4.3.2.). The relationship of these activity changes with hormonal changes, which occur during moulting, seems evident. The similarity of the hepatopancreatic zymogram patterns in stage A_2-B_1 with those of the sinus glandless crayfishes strengthen this assumption, as the neurosecretory activity of the sinus gland declines in general during moulting. Unlike the situation in the hepatopancreas, the 'acid' phosphatase and amylase activities in the hemolymph of postmoult crayfishes are higher. The important shifts in glycogen storage between the hepatopancreas and the integument, involves an increase of the hydrolytic (amylolytic and phosphorolytic) activity.

The transition from spring-summer to autumn causes remarkable changes in the hepatopancreatic esterase and phosphatase activities (4.3.3.), which are comparable with the corresponding changes after sinus gland extirpation. According to this the season influence may be related to changes in the neuroendocrine system.

The present studies suggest that the seasons, as exogenic parameters, call up the changes in hydrolase activities via the neurosecretory system of the eyestalk, which is associated with moulting. Alternately, the seasons might induce moulting via the neurosecretory system and consequently cause the variations in hydrolase activity.

BIJLAGEN

7.1 VERVELLINGSCYCLUS VAN DE CRUSTACEA, MET NAME *ASTACUS SP*

De levenscyclus van een typisch decapode Crustacee wordt beheerst door een opeenvolging van vervellingsstadia, tijdens welke ingrijpende morfologische en fysiologische veranderingen optreden (zie hoofdstuk 4). Om die reden wordt hier de vervellingscyclus weergegeven, afgeleid van de vervellings-schema's van Drach (1939), Carlisle en Dohrn (1953) en Passano (1960) en aangepast aan *Astacus sp*.

Code	Stadium Diagnose	% van de gehele cyclus	Water- gehalte (%)	Morfologische en fysiologische kenmerken
ST. A	(postmoult, metecdysis) pas verveld			
A ₁	pereiopoden week	0,5	87	wateropname duurt voort, mineralisatie zet in, bewegingen zijn minimaal
A ₂	week pereiopoden steviger	1,5	86	watergehalte maximaal, optimale mineralisatie van de exocuticula
St B	('paper-shell' stage)			
B ₁	propodus en merus flexibel, doch niet breekbaar	3,0	85	beginfase van de secretie van de endocuticula, voedselopname, voortbeweging mogelijk
B ₂	propodus en merus breekbaar	5,0	83	versteving van de scharen, weefselgroei, drooggewicht stijgt
St C	(intermoult, an- of diecdysis)			
C ₁	'hard-shelled' maar flexibel	8	80	weefselgroei optimaal, zuurstofverbruik minimaal, bloedhemocyaninen minimaal

Code	Stadium Diagnose	% van de gehele cyclus	Water- gehalte (%)	Morfologische en fysiologische kenmerken
C ₂	elasticiteit verdwenen	13	76	weefselgroei, watergehalte daalt
C ₃	calcificatie van exocuticula beëindigd	15	68	basaaalmembraanvorming, watergehalte neemt verder af
C ₄	'intermoult'	30 ⁺	60	optimale opslag van organische componenten, watergehalte minimaal
St. D	(pre-moult, proecdysis)			
D ₀	begin van epicutilavorming	10 ⁺	60	epidermale cellen worden groter en komen los van het exoskelet, zuurstofverbruik stijgt, regeneratie-groei begint
D ₁	epicuticula gevormd	5	?	resorptie van oud exoskelet, zuurstofverbruik maximaal
D ₂	'peeler'	5	76	secretie van nieuwe exocuticula, bewegingsactiviteit daalt
D ₃	'flaking-shell'	3	?	voedselopname beëindigd, optimale resorptie van oud exoskelet, regeneratie-groei stopt
D ₄	—	1	?	ionenconcentratie optimaal
St. E	(moult, ecdysis)			
	eigenlijke vervelling	0,5—	snelle stijging	oud exoskelet breekt open, het dier kruipt uit de schaal door spierbewegingen

7.2 NOMENCLATUUR VOOR DE 'MULTIPLE MOLECULAR FORM' DER ENZY- MEN

Toen Markert en Moller in 1959 de term 'isozyme' of 'isoenzyme' invoerden, was het evident dat daarmee de multiële moleculaire vormen der enzymen werden aangegeven, die o.a. door elektroforese gescheiden worden. In 1964 achtte de Internationale Unie voor Biochemie (IUB) het wenselijk deze multiële enzymvormen, die in eenzelfde organisme voorkomen en ten-

minste één gemeenschappelijk substraat afbreken, als isozym of isoenzym te beschouwen. In de afgelopen jaren werden echter bezwaren geopperd tegen het algemeen gebruik van deze term en werden nieuwe restricties voorgesteld voor de definitie van het eigenlijke isoenzym. Op grond hiervan werd door de IUB in 1971 een tweede voorstel gedaan, namelijk:

1. De term 'multiple forms of enzymes' als algemene term te gebruiken voor proteïnen, die dezelfde enzymatische activiteiten vertonen en in eenzelfde species voorkomen;
2. de term 'isozyme' of 'isoenzyme' uitsluitend voor die multiële enzymvormen te gebruiken, waarvan bekend is dat de verschillen in primaire structuur genetisch gedetermineerd zijn.

Tot op heden is niet bekend of de enzymheterogeniteit, die na elektroforetische scheiding van orgaanextracten van Crustacea optreedt, genetisch wordt gecodeerd. Op grond van bovengenoemd voorstel maken wij gebruik van de omschrijving: enzymatisch actieve band, fractie of component wanneer in de zymogrammen meerdere specifieke banden optreden.

7.3. HERKOMST VAN DE SPECIFIEKE CHEMICALIEN

acrylamide	Eastman-Kodak Company
ammoniumperoxodisulfaat	U.C.B.
amylose	B.D.H.
amylose remazobrlhant blue (RBB) (= amylose Azur B grade)	Calbiochem Inc.
α_1 -antitrypsine	Behringwerke (OpNr 18371 Fr.27-63)
azorubine S	Gurr
azur A	Gurr
BANA (= N ^{α} -benzoyl-DL-arginine- β -naphthylamide)	Sigma Chemical Co.
BPNA (= N ^{α} -benzoyl-DL-phenylalanine- β -naphthylamide)	Sigma Chemical Co.
BIS (= N,N'-methyleenbisacrylamide)	Eastman-Kodak Company
cryoform	International Equipment
DFP (= diisopropylfluorofosfaat)	Koch-Light Laboratories Ltd.
esernesulfaat	Sigma Chemical Co.
fast blue BB	Sigma Chemical Co.
fast blue RR	Serva

fast green FCF	Gurr
Fast red TR	Dajac Laboratories
hemoglobine (substraatpoeder, van rund)	Serva
naphthol-AS-MX-fosfaat	Sigma Chemical Co
naphthol geel S	Schuchardt
α -naphthylacetaat	Sigma Chemical Co
α -naphthyl-AS-D-acetaat	Sigma Chemical Co
α -naphthylbutyraat	Sigma Chemical Co
Na- α -naphthylfosfaat	Sigma Chemical Co
β -naphthyllauraat	Sigma Chemical Co
α -naphthylpropionaat	Sigma Chemical Co
p-nitrophenylfosfaat (Na-zout)	Sigma Chemical Co
p-nitrophenylpropionaat (Na-zout)	Sigma Chemical Co
ovomucoid	Calbiochem Inc
ponceau rood S	Chroma
red violet LB	Sigma Chemical Co
SBI	Calbiochem Inc
(= Sojabonen-trypsine-inhibitor)	
Sephadex G-200	Pharmacia Fine Chemicals
TEMED	B D H
(= N,N,N',N'-tetramethyldiaminoethaan)	
TLCK	Serva
(= L-1-chloro-3-p-tosylamido-7-amino-2-heptanone ∞ N- α -p-tosyl-L-lysine chloromethylketone)	
TPCK	Serva
(= L-1-chloro-3-p-tosylamido-4-phenyl-2-butanone, ∞ tosylphenylalaninechloromethylketone)	
Trasylo [®] (Kallikrein-trypsine-inhibitor)	Bayer (GOS 390/31)
L (+) wijnsteenzuur	B D H
zetmeel	Riedel-De Haen

Routine-chemicalien, zoals bufferzouten, werden doorgaans van de firma Merck betrokken

LITERATUUR

- ABRAMOWITZ, R K & ABRAMOWITZ, A A (1940) Moulting, growth, and survival after eyestalk removal in *Uca pugnator* Biol Bull 78, 179-188
- ABUL-FADL, M A M & KING, E J (1949) Properties of the acid phosphatases of erythrocytes and of the human prostate gland Biochem J 45, 51-60
- AGRAWAL, V P (1962) A study of the influence of substrate and enzyme concentration on the activity of caecal amylase of *Orchestia gammarella* (Pallas) Enzymologia 25, 173-177
- AGRAWAL, V P (1963) Determination of the optimum pH for the activity of caecal invertase of *Corophium volutator* J Animal Morphol Physiol 10, 86-88
- AGRAWAL, V P (1964) Studies on the physiology of digestion in *Orchestia gammarella* Proc zool Soc Lond 143, 133-141
- AIKFN, D E (1969) Photoperiod, endocrinology and the Crustacean molt cycle Science 164, 149-155
- ANDREWS, P (1967) Über den Blutchemismus des Flusskrebsses *Orconectes limosus* und seine Veränderungen im Laufe des Jahres Z vergl Physiol 57, 7-43
- ANSON, M L (1939) The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin J gen Physiol 22, 79-89
- APATHY, S von & FARKAS, B (1906) Beiträge zur Kenntnis der Darmdrüsen des Flusskrebsses Naturwissenschaftl Museumhefte (Koloswar) 1, 117-138
- APPLEBAUM, S H (1964) The action pattern and physiological role of *Tenebrio* larval amylase J Insect Physiol 10, 897-906
- APPLEBAUM, S H, JANKOVIC, M & BIRK, Y (1961) Studies in midgut amylase activity of *Tenebrio molitor* larvae J Insect Physiol 7, 100-108
- ARVY, L & GABE, M (1946) Identification des diastase sanguines chez quelques insectes C R Soc Biol (Paris) 140, 757-758
- AUGUSTINSSON, K B (1958) Electrophoretic separation and classification of blood plasma esterases Nature (Lond) 181, 1786-1789
- AUGUSTINSSON, K B (1961) Multiple forms of esterase in vertebrate blood plasma Ann N Y Acad Sci 94, 844-860
- BAKER, J R (1944) Quart J micr Sci 85, 1 In PEARSE, A G E (1961) Histochemistry (theoretical and applied) Little, Brown and Company, Boston
- BARKA, T (1961) Studies of acid phosphatases of rat liver on polyacrylamide gels J Histochem Cytochem 9, 542-547

- BAUCHAU, A G & MENGEOT, J C (1965) Proteases et amylases de l'hepatopancréas des crabes au cours du cycle de mue et d'intermue Ann Soc Roy Zool Belg 95, 29-37
- BELLA, S di, RICHETTA, G & PICHIERRI, U (1963) On pathological occurrence of glucose 6-phosphatase in blood serum Clin Chim Acta 8, 788
- BESSEY, O A, LOWRY, O H & BROCK, M J (1946) J biol Chem 164, 321 In Methoden der enzymatischen Analyse, ed H U BERGMAYER Verlag Chemie GmbH, Weinheim 1962
- BLANDAMER, A (1966) The purification and properties of an α -amylase from the hepatopancréas of *Carcinus maenas*, the common shore crab (similar to mammalian α -amylase) Biochim biophys Acta 118, 204-206
- BLANDAMER, A & BEECHEY, R B (1964) The identification of an α -amylase in aqueous extracts of the hepatopancréas of *Carcinus maenas*, the common shore crab Comp Biochem Physiol 13, 97-105
- BROWN Jr, F A (1942) Sinus gland extirpation in the crayfish without eyestalk removal Proc Soc exp Biol Med 50, 295-297
- BROWN Jr, F A (1968) Endogenous biorhythmicity reviewed with new evidence Scientia 103, 245-260
- BROWN Jr, F A, EDERSTROM, H E & SCUDAMORE, H H (1939) Sinus-glandectomy in Crustaceans without blinding Anat Rec 75 (Suppl.), 129-130
- BUNT, A H (1968) An ultrastructural study of the hepatopancréas of *Procambarus clarkii* (Girard) (Decapoda, Astacidea) Crustaceana 15, 282-288
- BURSTONE, M S (1957) The cytochemical localization of esterase J nat Cancer Inst 18, 167-172
- BURSTONE, M S (1958) Histochemical comparison of naphthol AS-substrates (Abstract) J Histochem Cytochem 6, 87
- BURSTONE, M S (1958) Histochemical comparison of naphthol AS-phosphates for the demonstration of phosphatases J nat Cancer Inst 20, 601
- BURSTONE, M S (1958) Histochemical demonstration of acid phosphatases with naphthol AS phosphates J nat Cancer Inst 21, 523-539
- BUSSELTN, P (1970) Effects of moulting cycle and nutritional conditions on hemolymph proteins in *Carcinus maenas* Comp Biochem Physiol 37, 73-83
- CARLISLE, D B (1953) Studies on *Lysmata seticaudata* Risso (Crustacea, Decapoda) Notes on the structure of neurosecretory system of the eyestalk Pubbl Staz zool Napoli 24, 435-447
- CARLISLE, D B & DOHRN, P F R (1953) Studies on *Lysmata seticaudata* Risso Experimental evidence for a growth and molt accelerating factor obtainable from eyestalks Pubbl Staz zool Napoli 24, 68-83
- CARLISLE, D B & KNOWLTON, F G W (1959) Endocrine control in Crustaceans Cambridge Univ Press, London and New York
- CARUS, D C G (1824) Von den ausseren Lebensbedingungen der heiss- und kaltblutigen

- COOK, B J , NELSON, D R & HIPPS, P (1969) Esterases and phosphatases in the gastric secretion of the cockroach *Periplaneta americana* J Insect Physiol 15, 581-589
- COUCH, E F & MILLS, R R (1968) The midgut epithelium of the American cockroach acid phosphomonoesterase activity during the formation of autophagic vacuoles J Insect Physiol 14, 55-62
- COWDEN, R R & COLEMAN, J R (1962) A starch gel electrophoretic study of haemolymph proteins of some Bermuda Crustacea Experientia 18, 265-266
- CUÉNOT, L (1895) Etudes physiologiques sur les Crustacés décapods Arch Biol (Liege) 13, 245-303
- DADD, R H (1970) Digestion des insectes In Chemical Zoology, eds M FLORKIN & B T SCHEER Vol V Arthropoda, part A, p 117-145 Academic Press, New York
- DAMBOVICEANU, A (1932) Composition chimique et physico-chimique du liquide cavitare chez les Crustacés décapodes (physiologie de la calcification) Arch roum Pathol exp Microbiol 5, 239-309
- DAVIS, B J (1962) Disc-electrophoresis (reprint) Distillation Prod Div Eastman Kodak Co, Rochester, N Y
- DAVIS, B J (1964) Disc-electrophoresis II Method and application to human serum proteins Ann N Y Acad Sci 121, 404-427
- DAVIS, L E & BURNETT, A L (1964) A study of growth and cell differentiation in the hepatopancreas of the crayfish Developm Biol 10, 122-153
- DECLAIR, W (1961) The localization of copper in agar gel Electrophoretic patterns of crustacean blood Naturwissenschaften 48, 102
- DENKER, H W (1969) Substratfilmtest für den Proteasenachweis In Histochemie der Ultrastruktur Verhandlungen der Gesellschaft für Histochemie, XIII Symposium, September 1969 Acta Histochem, Suppl Bd 10
- DENUCE J M (1967) Phosphatases and esterases in the digestive gland of the crayfish (*Orconectes virilis*) Arch int Physiol Biochim 75, 159-160
- DENUCE, J M (1969) Histophoresis Electrophoretic separation of proteins contained in individual cryostat sections Arch int Physiol Biochim 77, 1-20
- DJANGMAH, J S (1970) The effects of feeding and starvation on copper in the blood and hepatopancreas and on blood proteins of *Crangon vulgaris* Comp Biochem Physiol 32, 709-731
- DJANGMAH, J S & GROVE, D J (1970) Blood and hepatopancreas copper in *Crangon vulgaris* (Fabricius) Comp Biochem Physiol 32, 733-745
- DOANE, W W (1967) Quantitation of amylases in *Drosophila* separated by acrylamide gel electrophoresis J exp Zool 164, 363-378
- DORMAN, H P (1928) The morphology and physiology of the hepatopancreas of *Cambarus virilis* J Morph 45, 505-535

- DRACH, P (1939) Mue et cycle d'intermue chez les Crustacés décapods Ann Inst Océanogr 19, 103-391
- DRACH, P (1944) Etude préliminaire sur le cycle d'intermue et son conditionnement hormonal chez *Leander serratus* (Pennant) Bull biol Fr Belg 78, 40-62
- DRACH, P & GABE, M (1962) Evolution cyclique de la neurosecretion de l'organe X des Caridides au cours de l'intermue C R Acad Sci Paris 254 165-167
- DRILHON, A (1935) Etude biochimique de la mue chez les Crustacés Brachyours (*Maia squinado*) Ann Physiol Physicochim biol 11, 301-326
- DURAND, J B (1956) Neurosecretory cell types and their secretory activity in the crayfish Biol Bull 111, 62-76
- ENGELBERG, H (1964) Hepann and the removal of triglyceride from the blood stream In Int Symposium on Hepann, Los Angeles Amer J Cardiol 14, 8-17
- ESTBORN, B (1964) Separation of phosphatase isoenzymes by gel filtration Z klin Chem 2, 53-54
- FINGERMAN, M, DOMINICZEK, T, MIYAWAKI, M, OGURO, C & YAMAMOTO, Y (1967) Neuroendocrine control of the hepatopancreas in the crayfish *Procambarus clarkii* Physiol Zool 40, 23-30
- FISHMAN, W H, GREEN, S & INGLIS, N I (1962) Organ-specific behavior exhibited by rat intestine and liver alkaline phosphatase Biochim Biophys Acta 62, 363-375
- FLODIN, P (1962) Dextran gels and their applications in gel filtration Thesis, Univ Uppsala AB Pharmacia, Uppsala
- FOLIN, O & CIOCALITU, V (1927) Tyrosine and tryptophan determinations in proteins J biol Chem 73, 627
- FRENZEL, J (1893) Die Mitteldarmdrüse des Flusskrebse und die amitotische Zellteilung Arch mikrosk Anat 41, 389-451
- FULLER, E G & OWCZARZAK, A (1967) Esterases, phosphatases and glycogen in the antennal gland of *Pacifastacus leniusculus* Stimpson Biol Bull 133, 539-547
- GABE, M (1953) Sur quelques applications de la coloration par la fuchsineparaldehyde Bull Micr appl 3, 153-162
- GABE, M (1967) Neurosecretion Gauthier-Villars, Paris
- GEORGE, W C & NICHOLS, J (1948) A study of the blood of some Crustacea J Morph 83, 425-443
- GEORGI, R (1969) Feinstruktur und Bildung pentrophischer Membranen bei Crustaceen Z Morph Tiere 65, 225-273
- GLYNN, J P (1968) Studies on the ionic, protein and phosphate changes associated with the moult cycle of *Homarus vulgaris* Comp Biochem Physiol 26, 937-946
- GOMORI, G (1941) The distribution of phosphatase in normale organs and tissues J cell comp Physiol 17, 71-83
- GOMORI, G (1941) Distribution of acid phosphatase in the tissues under normal and under pathologic conditions Arch Path 32, 189-199

- GOMORI, G (1941) Observations with differential stains on human islets of Langerhans
Amer J Path 17, 395
- GOMORI, G (1950) Aldehyde-fuchsin A new stain for elastic tissue Amer J Clin Path
20, 665-666
- GOMORI, G (1950) An improved histochemical technic for acid phosphatase Stain
Technol 25, 81-87
- GOMORI, G (1951) Alkaline phosphatases of cell nuclei J Lab Clin Med 37, 526-531
- GORELL, Th A & GILBERT, L I (1969) Stimulation of protein and RNA synthesis in
the crayfish hepatopancreas by crustecdysone Gen comp Endocrinol 13,
308-310
- GREGOIRE, Ch (1962) Blood coagulation In Comparative Biochemistry, eds M
FLORKIN & H S MASON Vol IV, p 435 Academic Press, New York
- HANSTRÖM, B (1931) Neue Untersuchungen über Sinnesorgane und Nervensystem der
Crustaceen I Z Morph Okol Tiere 23, 80-236
- HANSTRÖM, B (1933) Neue Untersuchungen über Sinnesorgane und Nervensystem der
Crustaceen II Zool Jb (Abt Anat) 56, 387-520
- HANSTROM, B (1937) Die Sinusdrüse und der hormonal bedingte Farbwechsel der
Crustaceen Kungl Svenska Vetenskap Handl, Ser 3, 16, 1-99
- HANSTROM, B (1947) The brain, the sense organs, and the incretory organs of the
head in the Crustacea Malacostraca. Kgl Fysiograf Sällskap, Lund, Handl
(N F) 58, 3-44
- HARDY, W B (1892) The blood corpuscles of the Crustacea together with a suggestion
as to the origin of the Crustacea fibrin-ferment J Physiol (Lond) 13,
165-190
- HARREVELD, H van (1936) A physiological solution for freshwater Crustaceans Proc
Soc exp Biol Med 34, 428-432
- HEARING, V J (1969) Demonstration of acid phosphatase activity in the granules of the
blood cells of the lobster, *Homarus americanus* Chesapeake Sci 10, 24-28
- HERBOLD, D, ZWILLING, R & PFLEIDERER, G (1971) The evolution of endo-
peptidases XIII Biochemical and immunological studies on trypsin and a
low-molecular protease from the decapode *Carcinus maenas* Hoppe-Seyler's
Z physiol Chem 352, 583-592
- HERP, F van (1970) Study of the influence of sinus gland extirpation on the alkaline
phosphatase in the hepatopancreas of the crayfish *Astacus leptodactylus*
Comp Biochem Physiol 34, 439-445
- HERP, F van, GERAEDTS, J P M & DENUCE, J M (1972) Electrophoretic analysis of
neurosecretory substances in *Astacus leptodactylus* Arch int Physiol
Biochim 80, 415-416
- HIGNAM, K C (1962) Neurosecretory control of ovarian development in the desert
locust Mem Soc Endocr 12, 379-390
- HIGNAM, K C (1965) Some aspects of neurosecretion in Arthropods Zool Jb (Abt

- HIGNAM, K C (1967) Estimates of neurosecretory activity during maturation in female locusts Insect Endocrines Brno
- HIGNAM, K C, HILL, L & MORDUE, W (1966) The endocrine system and oocyte growth in *Schistocerca* in relation to starvation and frontal ganglionectomy J Insect Physiol 12, 977-994
- HIMES, M & MORIBER, L (1956) Stain Technol 31, 67 In GABE, M (1968) Techniques Histologiques Masson & Cie., Paris
- HIRSCH, G C & JACOBS, W (1928) Der Arbeitsrhythmus der Mitteldarmdrüse von *Astacus leptodactylus* I Methodik und Technik Der Beweis der Periodizität. Z vergl. Physiol 8, 102-144
- HIRSCH, G C & JACOBS, W (1930) Der Arbeitsrhythmus der Mitteldarmdrüse von *Astacus leptodactylus* II Wachstum als primärer Faktor des Rhythmus eines polyphasischen organigen Sekretionssystems. Z vergl Physiol 12, 524-558
- HOPPE-SEYLER, F (1877) Über Unterschiede im chemischen Bau und der Verdauung höherer und niederer Thiere Pflüger's Arch ges. Physiol 14, 395-400
- HORN, E C & KERR, M S (1969) The hemolymph proteins of the blue crab *Callinectes sapidus* I Hemocyanins and certain other major protein constituents Comp Biochem Physiol 29, 493-508
- HUNTER, R. L. & BURSTONE, M S. (1960) The zymogram as a tool for the characterization of enzyme substrate specificity J Histochem Cytochem 8, 58-62
- JACOBS, W (1928) Untersuchungen über die Cytologie der Sekretbildung in der Mitteldarmdrüse von *Astacus leptodactylus* Z Zellforsch mikrosk Anat 8, 1-62
- JEUNIAUX, C (1960) Chitinasés et chitobiases dans les tissus épidermiques, l'hépatopancréas et le tube digestif du crabe *Eriocheir sinensis* (M Edwards). Arch. int. Physiol Biochim 68, 684-685
- JEUNIAUX, C (1963) Action comparée du pH sur l'activité des chitinasés d'Invertébrés et des chitinasés gastriques de Vertébrés Arch int Physiol Biochim 71, 307-309
- JEUNIAUX, C (1971) Hemolymph-Arthropoda In Chemical Zoology, eds M FLORKIN & B T SCHEER Vol V Arthropoda, part B, p 61-118 Academic Press, New York
- JONES, J C (1962) Current concepts concerning insect hemocytes Amer Zool 2, 209-246
- KELLER, R (1969) Untersuchungen zur Artspezifität eines Crustaceenhormons. Z vergl Physiol 63, 137-145
- KINCAID, F D & SCHEER, B T (1952) Hormonal control of metabolism in Crustaceans IV Relation of tissue composition of *Hemigrapsus nudus* to intermolt cycle and sinus gland Physiol Zool 25, 372-380
- KLEINE, R (1966) Carbonic acid esterase and protease spectrum of the gastric juice and the hepatopancreas of the river crayfish *Astacus astacus* L Naturwissenschaft-

- KLEINE, R (1967) Occurrence and properties of proteolytic enzymes in the gastric juice and hepatopancreas of the crayfish *Astacus astacus* (L) and *Cambarus affinis* (Say) II Endopeptidases Z vergl Physiol 55, 51-69
- KLEINE, R (1967) Occurrence and properties of the carboxylic esterases in hepatopancreas and gastric juice of the crayfish *Astacus astacus* and *Cambarus affinis* Z vergl Physiol 55, 333-353
- KLEINE, R (1967) The differential behavior of the exopeptidases from the hepatopancreas and gastric juice of the crayfish *Astacus astacus* (L) and *Cambarus affinis* (Say) during gel filtration of Sephadex and towards effectors Z vergl Physiol 56, 142-153
- KLEINE, R & PONYI, J (1967) Occurrence and properties of proteolytic enzymes in the gastric juice and hepatopancreas of the crayfish *Astacus astacus* (L) and *Cambarus affinis* (Say) I Exopeptidases Z vergl Physiol 55, 49-50
- KLEINHOLZ, L H (1947) A method for the removal of the sinus gland from the eyestalk of Crustaceans Biol Bull 93, 52-55
- KOOIMAN, P (1964) The occurrence of carbohydrases in digestive juice and in hepatopancreas of *Astacus fluviatilis* (Fabr) and of *Homarus vulgaris* (M E) J cell comp Physiol 63, 197-202
- KUGLER, O E & BIRKNER, M L (1948) Histochemical observations of alkaline phosphatase in the integument, gastrolith sac, digestive gland and nephridium of the crayfish Physiol Zool 21, 105-110
- KURUP, N G (1964) The intermolt cycle of an anomuran *Petrolisthes cinctipes* (Randall) (Crustacea-Decapoda) Biol Bull 127, 97-107
- KURUP, N G & SCHEER, B T (1966) Control of protein synthesis in an anomuran Crustacean Comp Biochem Physiol 18, 971-973
- KVISTBERG, D, LESTER, G & LAZAROV, A (1966) Staining of insulin with aldehyde fuchsin J Histochem Cytochem 14, 609-611
- LAKE, P S (1970) Histochemical studies of the neurosecretory system of *Chirocephalus diaphanus* (Prevost - Crustacea-Anostraca) Gen comp Endocrinol 14, 1-14
- LAUFER, H (1961) Forms of enzymes in insect development Ann N Y Acad Sci 94, 825-835
- LIBERTI, J P (1968) Rapid spectrophotometric determination of p-nitrophenylpropionate esterase activity in rat tissues Analyt Biochem 23, 53-59
- LINDNER, X In ARVY, L (1969) Les enzymes chez les Crustacés Année biol 8, 505-580
- LOIZZI, R F (1971) Interpretation of crayfish hepatopancreatic function based on fine structural analysis of epithelial cell lines and muscle network Z Zellforsch 113, 420-440
- LOIZZI, R F & PETERSON, D R (1971) Lipolytic sites in crayfish hepatopancreas and correlation with fine structure Comp Biochem Physiol 39B, 227-236

- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.* **193**, 265-275.
- MANDER, S.T.K., MANDER, L.N. & CARMICHAEL, G.G. (1968) The staining mechanism of aldehyd-fuchsin, with reference to the oxytalan-fiber in the mouse. *J. Histochem. Cytochem.* **16**, 480.
- MANSOUR-BEK, J.J. (1954) The digestive enzymes in Invertebrata and Protochordata. *Tabul. biol. (The Hague)* **21**, 75-367, 368-382.
- MARKERT, C.L. & HUNTER, R.L. (1959) The distribution of esterases in mouse tissues. *J. Histochem. Cytochem.* **7**, 42-49.
- MARKERT, C.L. & MØLLER, F. (1959) Multiple forms of enzymes, tissue, ontogenic and species specific patterns. *Proc. nat. Acad. Sci.* **45**, 753-763.
- MARTIN, A.L. (1966) Feeding and digestion in two intertidal gammarids. *Marinogammarus obtusatus* and *M. pirloti*. *J. Proc. Zool. Soc. London* **148**, 515-525.
- MAURER, H.R. (1968) Disk-Elektrophorese. Walter de Gruyter & Co., Berlin.
- McWHINNIE, M.A. & CHUA, A.S. (1964) Hormonal regulation of Crustacean tissue metabolism. *Gen. comp. Endocrinol.* **4**, 624-633.
- McWHINNIE, M.A. & CORKILL, A.J. (1964) The hexosemonophosphate pathway and its variation in the intermolt cycle in crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* **12**, 81-93.
- McWHINNIE, M.A. & KIRCHENBERG, R.J. (1962) Crayfish hepatopancreas metabolism and the intermolt cycle. *Comp. Biochem. Physiol.* **6**, 117-128.
- McWHINNIE, M.A. & KIRCHENBERG, R.J. (1966) Phosphatase activity in the hepatopancreas of the crayfish *Orconectes virilis*. *Amer. Zool.* **6**, Abstract 336.
- McWHINNIE, M.A. & MOHRHERR, C.J. (1970) Influence of eyestalk factors, intermolt cycle and season upon ^{14}C -leucine incorporation into protein in the crayfish (*Orconectes virilis*). *Comp. Biochem. Physiol.* **34**, 415-437.
- MEWS, H.H. (1957) Über die Temperaturadaptation der Sekretion von Verdauungsfermenten und deren Hitzeresistenz. *Z. vergl. Physiol.* **40**, 345-355.
- MIYAWAKI, M., MATSUZAKI, M. & SASAKI, N. (1961) Histochemical studies on the hepatopancreas of the crayfish *Procambarus clarkii*. *Kumamoto J. Sci., Ser. B* **5**, 161-169.
- MIYAWAKI, M. & TANOUE, S. (1962) Electron microscopy of the hepatopancreas in the crayfish *Procambarus clarkii*. *Kumamoto J. Sci., Ser. B* **6**, 1-12.
- MORDUE, M. (1967) The hormonal control of excretion and water balance in locusts. *Insect Endocrines Brno*.
- MORDUE, M. (1967) The influence of feeding upon the activity of the neuroendocrine system during oocyte growth in *Tenebrio molitor*. *Gen. comp. Endocrinol.* **9**, 406-415.
- MUNDAY, K.A. & HUGGINS, A.K. (1968) Crustacean metabolism. In: *Advances in Comparative Physiology and Biochemistry*, ed. O. LOWENSTEIN. Vol. 3, p. 271-378. Academic Press, New York.

- NEILAND, K A & SCHEER, B T (1953) The influence of fasting and of sinus gland removal on body composition of *Hemigrapsus nudus* *Physiol comp et Oecol* **3**, 321-326
- NISSELBAUM, J S, SCHLAMOWITZ, M & BODANSKY, O (1961) Immunochemical studies of functionally similar enzymes *Ann N Y Acad Sci* **94**, 970-988
- O'CONNOR, J D & GILBERT, L I (1967) Alterations in Crustacean lipid metabolism during the molt cycle *Amer Zool* **7**, 767 (Abstract)
- O'CONNOR, J D & GILBERT, L I (1968) Aspects of lipid metabolism in Crustaceans *Amer Zool* **8**, 529-539
- OGURA, K (1959) Midgut gland cells accumulating iron or copper in the crayfish *Procambarus clarkii* *Annot Zool Japon* **32**, 133-142
- PASSANO, L M (1960) Molting and its control. In *The Physiology of Crustacea*, ed T H WATERMAN Vol I Academic Press, New York London
- PASTEUR, C (1959) *Bull Sci Nat Phys Maroc* **39**, 146-155. In WORMHOUDT, A van et al (1972) Sur l'activité des enzymes digestives au cours du cycle d'intermue chez *Palaemon serratus* *C R Acad Sci Paris, Ser D* **274**, 1337-1340
- PEARSE, A G E (1961) *Histochemistry (theoretical and applied)* Little, Brown and Company, Boston
- PERALTA, O & REINHOLD, J G (1955) Rapid estimation of amylase activity of serum by turbidimetry *Clin Chem* **1**, 157-164
- PFLEIDERER, G, ZWILLING, R & SONNEBORN, H H (1967) Eine Protease vom Molekulargewicht 11000 und eine trypsinähnliche Fraktion aus *Astacus fluviatilis* *Fabr Hoppe-Seyler's Z physiol Chem* **348**, 1319-1331
- PLANTEVIN, G & NARDON, P (1970) Histologie et activité sécrétoire de l'intestin moyen des larves de *Pieris brassicae* et *Galleria mellonella* *Ann Zool Écol anim* **2**, 25-50
- PLANTEVIN, G, NARDON, P & LAVIOLETTE, P (1968) Evolution de l'activité enzymatique du mésentéron de larves de *Galleria mellonella* en culture. Second Int Colloquium on Invertebrate Tissue Culture, Trezzano, p 81-101
- PUYEAR, R L (1967) The glucuronic acid pathway in the blue crab *Callinectes sapidus*. The enzymes of the UDP glucose to glucuronic acid portion of the pathway *Comp Biochem Physiol* **20**, 499-508
- PUYEAR, R L (1969) Molt cycle regulation of nucleotide pyrophosphatase in the hepatopancreas of the blue crab *Callinectes sapidus* (Rathbun) *Comp Biochem Physiol* **28**, 159-168
- RAUEN, H (1964) *Biochemisches Taschenbuch* Springer Verlag, Berlin
- RAY, D L & JULIAN, J R (1952) Occurrence of cellulase in *Limnoria* *Nature (Lond)* **169**, 32-33
- Recommendations (1964) of the International Union of Biochemistry on the nomenclature and classification of enzymes, together with their units and the symbols of enzyme kinetics Elsevier Publishing Company, New York, 1965

- Recommendations (1971) IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature The nomenclature of multiple forms of enzymes recommendations Arch Biochem Biophys **147**, 1-3
- RENAUD, L (1949) Le cycle des reserves organiques chez les Crustacés decapodes Ann Inst Océanogr **24**, 259-357
- RESSLER, N, SPRINGATE, R & KAUFMAN, J (1961) A method of lipoprotein electrophoresis J Chromatogr **6**, 409-415
- RINDERKNECHT, H, WILDING, P & HAVERBACK, B J (1967) A new method for the determination of α -amylase Experientia **23**, 805
- ROCHE, J & LATREILLE, M (1934) Sur les phosphatases du sang et de l'hémolymph C R Soc Biol **116**, 1033-1034
- RODYN, D B (ed) (1967) Enzyme cytology Academic Press, New York
- ROMEIS, B (1948) Taschenbuch der mikroskopischen Technik Oldenburg-München
- ROWE, A W & WEILL, C E (1962) The inhibition of β -amylase by ascorbic acid II Biochim Biophys Acta **65**, 245-251
- SCHEER, B T (1960) Aspects of the intermolt cycle in Natantians Comp Biochem Physiol **1**, 3-18
- SCHLEMM, T F G (1844) De hepate ac bile Crustaciorum et Molluscorum quorundam Schadeanis, Berolini 44 pp, 2 pl h t
- SJÖGREN, S (1934) Die Blutdrüse und ihre Ausbildung bei den Decapoden Zool Jb (Anat) **58**, 145-170
- SCHREINER, B, STAALAND, H & JOHANSSON, A S (1969) Functional significance of neurosecretory cells in the last abdominal ganglion of the lobster, *Homarus vulgaris* L Gen comp Endocrinol **13**, 399-402
- SKINNER, D M (1965) Amino acid incorporation into protein during the molt cycle of the land crab, *Gecarcinus lateralis* J exp Zool **160**, 226-233
- SPANNHOF, L (1967) Einführung in die Praxis der Histochemie VEB Gustav Fisher Verlag, Jena
- SPECK, U & URICH, K (1969) Der Abbau körpereigener Substanzen in dem Flusskrebs *Orconectes limosus* Z vergl Physiol **63**, 410-414
- SPECK, U & URICH, K (1970) Das Schicksal der Nährstoffe bei dem Flusskrebs *Orconectes limosus* II Resorption $U^{14}C$ markierter Nährstoffe und ihre Verteilung auf die Organe Z vergl Physiol **68**, 318-333
- STAMATI, M (1888) Sur le suc gastrique de l'écrevisse C R Soc Biol **40**, 16
- STANG-VOSS, C (1971) Zur Ultrastruktur der Blutzellen wirbelloser Tiere V Über die Hamocyten von *Astacus astacus* (L) Z Zellforsch **122**, 68-75
- STEVENSON, J R, GUCKERT, R H & COHEN, J D (1968) Lack of correlation of some proecdysial growth and developmental processes in the crayfish Biol Bull **134**, 160-175
- STREET, H V & CLOSE, J R (1956) Clin Chim Acta **1**, 256 In Methoden der enzymatischen Analyse, ed H U BERGMAYER Verlag Chemie GmbH Weinheim

- TAIT, J & GUNN, J D (1918) The blood of *Astacus fluviatilis* A study in Crustacean blood, with special reference to coagulation and phagocytosis *Quart J exp Physiol* **12**, 35-80
- TAKAHASHI, T, MORISHITA, T & TACHINO, S (1964) The digestive enzymes of the spiny lobster *Panulirus japonicus* *Rep Fac Fish Prefect, Univ Mie* **5**, 127-135
- THOMSEN, E & MØLLER, I (1959) Neurosecretion and intestinal proteinase activity in an insect, *Calliphora erythrocephala* Meig *Nature (Lond)* **183**, 1401-1402
- THOMSEN, E & MØLLER, I (1963) Influence of neurosecretory cells and of corpus allatum on intestinal protease activity in the adult *Calliphora erythrocephala* Meig *J exp Biol* **40**, 301-321
- THORNBOROUGH, J R (1968) Neuroendocrine repression of ribonuclease in the prawn *Palaeomonetes vulgaris* *Comp Biochem Physiol* **24**, 625-628
- TORABALLA, G C & EITINGTON, M (1967) Action of urea and certain other amide reagents on crystalline porcine pancreatic amylase *Arch Biochem Biophys* **119**, 519-525
- TRAVIS, D F (1955) The molting cycle of the spiny lobster, *Panulirus argus* Latreille II Pre-ecdysial histological and histochemical changes in the hepatopancreas and integumental tissue *Biol Bull* **108**, 88 112
- TRAVIS, D F (1955) The molting cycle of the spiny lobster, *Panulirus argus* Latreille III Physiological changes which occur in the blood and urine during the normal molting cycle *Biol Bull* **109**, 485-503
- TRAVIS, D F (1957) The molting cycle of the spiny lobster, *Panulirus argus* Latreille IV Post-ecdysial histological and histochemical changes in the hepatopancreas and integumental tissues *Biol Bull* **113**, 451-479
- TREMBLAY, G (1962) The localization of amylase activity in tissue section by a starch film method *J Histochem Cytochem* **11**, 202-206
- UGLOV, R C (1969) Haemolymph protein concentrations in portunid crabs I Studies on adult *Carcinus maenas* *Comp Biochem Physiol* **30**, 1083-1090
- UGLOV, R C (1969) Haemolymph protein concentrations in portunid crabs II The effects of imposed fasting on *Carcinus maenas* *Comp Biochem Physiol* **31**, 959-967
- UGOLEV, A M (1968) Physiology and pathology of membrane digestion Plenum Press, New York
- URICH, K (1961) Mesenteron glands and insect fat bodies as central organs of metabolism *Ergeb Biol* **24**, 155 190
- VERCAUTEREN, R E & AERTS, F (1958) On the cytochemistry of the haemocytes of *Galleria mellonella* with special reference to polyphenoloxidase *Enzymologia* **20**, 167-172
- VILLEZ, E J de (1965) Isolation of the proteolytic digestive enzymes from the gastric

- juice of the crayfish *Orconectes virilis* Comp Biochem Physiol 14, 577-586
- VILLEZ, E J de & BUSCHIEN, K (1967) Survey of a tryptic digestive enzyme in various species of Crustacea Comp Biochem Physiol 21, 541-546
- VONK, H J (1935) Die Eigenschaften des Verdauungssaftes von *Potamobius* (Ast.) *leptodactylus* und anderen Invertebraten in Bezug auf die Fettresorption Z vergl Physiol 21, 717-738
- VONK, H J (1937) The specificity and collaboration of digestive enzymes in Metazoa Biol Rev 12, 245-284
- VONK, H J (1960) Digestion and metabolism In The Physiology of Crustacea, ed T H WATERMAN Vol I, p 291-316 Academic Press, New York
- VONK, H J (1962) Emulgators in the digestive fluids of Invertebrates Arch int Physiol Biochem 70, 67-85
- VONK, H J (1964) Comparative biochemistry of digestive mechanism. In Comparative Biochemistry, eds M FLORKIN & H S MASON Vol 6, p 347-401 Academic Press, New York
- WACHTSTEIN, M, MEISEL, E & ORTIZ, J M (1962) Intercellular localization of acid phosphatase as studied in mammalian kidneys Lab Invest 11, 1243-1252
- WEBER, M (1880) Über den Bau und die Tätigkeit der sogenannten Leber der Crustaceen Arch mikrosk Anat 17, 385-457
- WEEL, P B van (1955) Processes of secretion, restitution and resorption in gland of midgut of *Atya spinipes* Newport Physiol Zool 28, 40-54
- WEEL, P B van (1960) On the secretion of digestive enzymes by the marine crab *Thalassina crenata* Z vergl Physiol 43, 567-577
- WEEL, P B van (1970) Digestion in Crustacea In Chemical Zoology, eds M FLORKIN & B T SCHEER Vol V Arthropoda, Part A, p 97-115 Academic Press, New York
- WELSH, J H (1941) The sinus glands and 24-hour cycles of retinal pigment migration in the crayfish J exp Zool 86, 35-49
- WORMHOUDT, A van, LE GAL, Y & CECCALDI, H J (1972) Sur l'activité des enzymes digestives au cours du cycle d'intermue chez *Palaemon serratus* C R Acad Sci Paris, Sér D 274, 1337-1340
- WYATT, G R (1961) The Biochemistry of insect hemolymph Ann Rev Entomol 6, 75-102
- YAMAMOTO, Y (1953) Studies on the sinus gland in the decapod Crustaceans I Effect of sinus gland on the midgut gland in the crayfish, *Procambarus clarkii* J Coll Arts Sci, Chiba Univ 1, 115-117
- YAMAMOTO, Y (1960) Effects of implantation of central nervous tissues on involution of the midgut gland following removal of eyestalks in the crayfish, *Procambarus clarkii* J Coll Arts Sci, Chiba Univ 3, 151-154
- YASUMASU, I & YOKOE, Y (1965) Release of cellulase activity from the microsome fraction of crayfish hepatopancreas by treatment with adenosine triphosphatase

- YOKOE, Y & YASUMASU, I (1964) The distribution of cellulase in Invertebrates
Comp Biochem Physiol 13, 323-338
- ZIEGLER & RATH, von In FRENZEL, J (1893) Die Mitteldarmdrüse des Flusskrebses
und die amitotische Zelltheilung Arch mikrosk Anat 41, 389-451.
- ZUCKERKANDL, E. (1956) La variation au cours du cycle d'intermue des fractions
protéiques de l'hémolymph de *Maia squinado* séparées per l'électrophorèse
C R.Séanc Soc.Biol. 150, 39-41
- ZWILLING, R, PFLIDERER, G, SONNEBORN, H H, KRAFT, V & STUCKY, I
(1969) The evolution of endopeptidases. V Common and different traits of
bovine and crayfish trypsin Comp Biochem Physiol 28, 1275-1287

Bij de voltooiing van dit proefschrift wil ik graag mijn oprechte dank betuigen aan allen, die aan het tot stand komen hebben bijgedragen

In het bijzonder gaat mijn erkentelijkheid uit naar het personeel en oud-studenten van het Zoologisch Laboratorium, die direct of indirect betrokken zijn geweest bij het werk en het gereedkomen van het manuscript

De hulp van de afdelingen Illustratie, Fotografie en het Universitair Rekencentrum van de Faculteit der Wiskunde en Natuurwetenschappen heb ik zeer gewaardeerd

Dr J H Dijkman van de Van Spanjekliniek te Groesbeek ben ik dankbaar voor het beschikbaar stellen van serum van emphyseempatienten na operatie De firma's Behringwerke AG (Marburg-Lahn) en de Farbenfabriken Bayer AG (Wuppertal-Elberfeld) dank ik voor het toesturen van de α_1 -antitrypsine respectievelijk Trasylol[®] preparaten, evenals de firma Agfa-Gevaert (Mortsel) voor het ter beschikking stellen van Diapositive Contrast platen

STELLINGEN

I

De conclusie van Hirsch en Jacobs dat voedselopname na hongeren ritmische veranderingen teweegbrengt in de hydrolase-activiteiten van de hepatopaneas bij de rivierkreeft is onjuist

Hirsch, G C & Jacobs, W (1928) *Z vergl Physiol* **8**, 102-144
Dit proefschrift

II

De sinusklier, een neurohemaal orgaan in de oogsteel van decapode crustaceen, werkt selectief op de hydrolase-activiteiten in de hepatopaneas van deze dieren

Dit proefschrift

III

Het feit dat steroid-hormonen in insekten en crustaceen, in extracten van hormoongevoelige celtypen gebonden zijn aan een eiwitcomponent is een onvoldoende indicatie om aan te nemen dat in deze lagere organismen 'hormoonreceptoren' voorkomen

Berendes, H D (1972) *Results and Problems in Cell Differentiation* (Springer-Verlag-Berlin) **4**, 181-207
Emmerich, H (1972) *J Gen Comp Endocrin* (in press)

IV

De vergelijking die Hotta en Stern maken tussen de biologische functie van het DNA-bindend eiwit in microsporen van *Lilium* en spermatocyten van enkele Mammalia enerzijds en het 'gene 32-protein' in T₄-bacteriofagen anderzijds gaat niet op

Hotta, Y & Stern, H (1971) *Developm Biol* **26**, 87-99
Hotta, Y & Stern, H (1971) *Nature (New Biology)* **234**, 83-86
Alberts, B et al (1971) *Federation Proceedings* **30**, Abstr 1036

V

Het synchroniseren van *in vitro* gekweekte cellen via mitotische selectie is voor de bestudering van de verschillende fasen van de celcyclus de enig betrouwbare methode

VI

Soortdiversiteit van plantengemeenschappen is geen bruikbare parameter voor de oecologische evaluatie van natuurgebieden

VII

Het gebruik van broomfenolblauw als 'marker' voor de migratiegrens bij de scheiding van eiwitten door middel van disc-elektroforese moet worden afgeraden

Hiebert, M et al (1972) *Analytical Biochemistry* 46, 433-437

VIII

Toepassing van uitsluitend histologische onderzoekmethoden op neurosecretorische cellen als indicatie van hun activiteit is, onder bepaalde omstandigheden, niet overtuigend

IX

De stelling van Hirsch en Jacobs dat het optreden van talrijke mitosen in het dorsaal coecum van de rivierkreeft zou bijdragen tot de restitutie van het epitheel in de hepatopancreastubuli lijkt onjuist

Hirsch, G C & Jacobs, W (1930) *Z vergl Physiol* 12, 524 558

X

De isolatie van de heteroagglutinines uit de hemolymfe van *Cancer pagurus* door middel van precipitatie van de hemocyanines met specifieke antistoffen, is voor kritiek vatbaar

XI

Bij vergelijkend oecologisch onderzoek naar de ei-afzetting en ei-ontwikkeling van *Rana*-soorten moet naast de temperatuursfactor ook rekening worden gehouden met de ei-grootte

XII

Bij de oprichting van een gemengde Nederlands-Belgische universiteit in Limburg dienen duidelijke linguïstische afspraken te worden gemaakt

